



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**ESCOLA D'ENGINYERIA
Departament d'Enginyeria Química**

Tesi doctoral

**CARACTERITZACIÓ DE L'OPERACIÓ I
ESTUDI METATRANSCRIPTÒMIC D'UN
BIOREACTOR DE DESSULFURACIÓ
D'ALTA CÀRREGA D'H₂S**

Supervisada pel Dr. David Gabriel Buguña i la Dra. Susana Campoy Sánchez

Roger Rovira Camprubí

Memòria de Tesi Doctoral
Programa de Doctorat en Biotecnologia

Barcelona, març de 2012

DAVID GABRIEL BUGUÑA, professor agregat del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona i **SUSANA CAMPOY SÁNCHEZ**, professora agregada, del Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEN:

Que el Llicenciat en Biotecnologia **ROGER ROVIRA CAMPRUBÍ** ha realitzat sota la nostra direcció el treball titulat: "**CARACTERITZACIÓ DE L'OPERACIÓ I ESTUDI METATRANSCRIPTÒMIC D'UN BIOREACTOR DE DESSULFURACIÓ D'ALTA CÀRREGA D'H₂S**", el qual es presenta en aquesta memòria i que constitueix la seva Tesi per a optar al Grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I perquè en prengueu coneixement i consti als efectes oportuns, presentem a l'Escola d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi, signant el present certificat a

Bellaterra, març de 2012

Dr. David Gabriel Buguña

Dra. Susana Campoy Sánchez

Dedico aquesta tesi als meus pares i a la meva germana, per ser-hi sempre
i haver fet possible que lluiti per les meves il·lusions

Per tu, perquè tot és per tu Marina

¿Qui sinó tots -i cadascú per torna-
podem crear des d'aquests límits d'ara
l'àmbit de llum on tots els vents s'exaltin,
l'espai de vent on tota veu ressoni?
Públicament ens compromet la vida,
públicament i amb tota llei d'indícis.

Serem allò que vulguem ser. Debades
fugim del foc si el foc ens justifica.

Miquel Martí i Pol. *L'àmbit de tots els àmbits* (1981)

AGRAÏMENTS

Quan arribes al final d'una etapa, en qualsevol aspecte de la vida, és llavors quan t'atures, reflexiones i valores l'experiència vital acumulada durant aquest temps. Han sigut uns anys de formació, de reptes, de treball, de creixement i coneixement que em fan sentir molt satisfet d'haver-los viscut. Per això m'agradaria agrair i recordar molta de la gent que m'ha envoltat durant aquesta etapa de la meva vida. Una etapa que estic convençut que recordaré amb molta estima.

No puc començar d'una altra manera que no sigui donant les gràcies al David per donar-me la oportunitat de realitzar la tesi al grup de recerca GENOCOV dins la part de tractament d'efluents gasosos. Et vull agrair tant el suport i confiança que m'has donat com la llibertat que he tingut en tot moment realitzant el meu projecte. He disfrutat i après moltíssim. Susana, moltíssimes gràcies per pujar en un tren en marxa. Tot hagués sigut molt diferent sense la teva ajuda, gràcies per marcar-me els canvis d'agulla. Heu sigut uns jefes i companys fantàstics que sempre recordaré!

Javier, un guru! Moltes gràcies pel suport i confiança dipositats! Admiro molt les teves reflexions i consells. Tens una gran habilitat per tractar a la gent i treure el millor de si. Gràcies per l'ajuda! També m'agradaria agrair i mencionar alguns dels professors del departament d'enginyeria química, que en algun moment o altre he tingut la sort de conèixer i tractar, Juan Baeza, Albert Guisasola, Toni Sánchez, Carles de Mas, Paco Valero, Pau Ferrer i Julio Pérez.

Marc, moltes *gracis* pel suport i experiència, a més dels savis consells pel que fa a l'operació del bioreactor. Tal i com deies a la teva tesi, he sigut el pare adoptiu dels teus "bitxitos" i crec que a dia d'avui encara no s'han queixat...jeje. Moltes gràcies per ser-hi, i d'altres vegades per convidar-me a ser-hi.

Jero, tot un mestre i company de viatge durant aquests 4 anys! Moltes gràcies per estar sempre disponible, com a amic i científic quan feia falta! Gràcies per la proximitat! es troben a faltar aquells esmorzars a mitges! sobretot quan el madrid perdia! jejeje grans viatges, festes, sopars i moments genials!

Juanpe gràcies, sobretot en els meus inicis al grup. Es podria dir que després de hores i hores de poiata colze a colze, sempre s'aprenen coses interessants. Que hi hagi molta sort per Austin!

Andrea, si jo he sigut el pare adoptiu dels "bitxitos", tu has sigut la mare adoptiva! I ara resulta que el pare se'n va de casa deixant la custòdia a la mare... Tot un vodevil! Espero que tinguis molta sort amb els nous experiments! Moltes gràcies per l'ajuda i la paciència amb els meus experiments!

Mabel i Luis, que us vagin molt bé al grup i disfruteu d'aquesta etapa! passa rapidíssim!! Laura, Patrizia i Tercia, moltes gràcies per l'entusiasme i voluntat que heu demostrat sempre en tots els experiments i estudis que hem fet! Les innumerables hores de FISH són impagables! Gràcies per l'ajuda!

Vull agrair moltíssim, l'amistat i ajuda dels companys de viatge del despatx. El QC-1139 l'únic despatx amb una única taula central i una peixera que la presideix (aprofito per agrair al Ramiro la Lola i els afegits, totes les hores de companyia). Joan, una de les persones amb un raonament més intel·ligent, honest, i sincer que he conegut en aquests 4 anys. Gràcies per les discussions i debats! Vem entrar al departament el mateix dia, i vem anar a parar al mateix despatx. Tant debò haguessis pogut disfrutar del viatge tant com jo. Que vagi molt bé per Durham! Sergi, ets un currante incansable! Admiro la teva capacitat! Moltes gràcies per l'ajuda i amistat des del primer dia. Han sigut moltes les hores que ens hem passat un davant de l'altre currant. Gràcies per ser-hi sempre. Aaah! I gràcies per fer gran el Barça! Jjejeje!! Belén, quantes hores junts al despatx... tot i que a vegades sense veure't. La peixera evita que ens veiem (alguns dies més que d'altres degut a la terbolesa de l'aigua jejeje). Que tinguem molta sort en aquesta nova etapa! Et quedes com la veterana del despatx! Andrea, l'última incorporació al despatx! Que et vagi tot molt bé i aprenguis moltíssim durant aquests quatre anys que ara comences. Segur que sí!. Lucia, que tinguem sort, perquè la necessitarem! ànims i força amb les causes socials!

Marcel, Torà, Carlota, moltes gràcies per ser com sou i l'amistat que hem fet durant aquest temps. Us trobaré molt a faltar! Els esmorzars futbolístics, els dinars al rectorat, confessions personals, plans de futur, discussions... són molts els bons moments que recordo! Que tinguem molta sort allà on decidim!

Els sopars α convocats per “l’espaldada plateada” de torn eren boníssims! Sergi, Joan, Jero, Marcel, Torà, Michele, Bartrolí, Oscar, Edu i Marc. Moltes gràcies amics!! Hem rigut moltíssim! i recordeu... sempre tindreu un “alpha” dins vostre! A la resta de companys del departament, Moltes gràcies! Michele, Edu, Kristin, Juanmi, Albert, Núria, Belén, Caterina, Juliana, Lucía, Marc, Alfred, Marina, Joel, Margot, Rim, Javi, Edu, Jose.

També vull agrair especialment als companys de la UPC de Manresa, el Xavi, el Toni i la Ginesta. Moltes gràcies per suportar les meves presentacions i explicacions esotèriques! Tant a les reunions de grup a l’ETSE, com a Whashington o Cádiz. M’heu ajudat molt i he après més de vosaltres!

No puc oblidar-me del Departament de Genètica i Micro, on m’hi han acollit pràcticament a jornada completa durant l’etapa “RNA” i m’hi he sentit molt a gust! Hem compartit ordinadors, cafès, discussions, dinars... Pobre Albert! Enmig de tanta dona!! Paciència nanu! Moltes gràcies Andrea per tot el suport, ajuda i bona cara en tots els moments! No em vull deixar a ningú, Laura Medina, Laura Teixidor, Meritxell, Joan, Susana, Pilar... Gràcies!!

Vull agrair el suport de la gent del Servei de Genòmica de la UAB, el Xavi, el Roger i l’Anna, per la multitud de proves amb el bioanalyzer. També voldria agrair l’ajuda de la Dra. Maria Vila Costa del CEAB de Blanes per la predisposició i ajuda en la purificació del mRNA de les meves mostres. Per altre costat, també voldria agrair especialment l’ajuda del Pedro Ferreira en la bioinformàtica d’aquesta tesi. He après moltíssim, gràcies Pedro!

Per acabar voldria recordar els meus primers 4 anys a la UAB. Perquè aquella primera etapa a la universitat, plena d’experiències i bona gent són una mica les arrels d’aquesta tesi. Va ser una època genial en que vaig conèixer gent fantàstica. La Jone, el Jofre, l’Ingrid, l’Alberto, la Paula, la Cinta, el Joan, l’Alba, la Bàrbara, el Pep, el Ferran, l’Uri, el Xavi, el Calipo i tants d’altres... Gent amb qui vaig viure moments guapíssims! Des de viatges, festes universitàries, partides de mus i botifarra, fins a filosofades i projectes utòpics (o no). Molt sovint em sap greu que els nostres camins s’hagin separat, si més no que no vagin tant paral·lels. Una abraçada!

També vull recordar amb un somriure la colla de Vilafranca! Quina gent tu...! És genial envoltar-se de gent com vosaltres! Moltíssimes gràcies Nooigonàs: Barrera, Padró, Miquel, Gomes, Ferran, Quim, Tèrmens, Clara, Eva, Blanca, Laura, Núria, Eli, Mireia, Cristina, Fina, Aina i la Cori!

Per altre costat una part molt important per a mi, ha estat la meva colla de Castellbisbal. Els amics de tota la vida. Els de la granja garrafot! Quantes històries i vivències... Moltes gràcies per ser-hi sempre! Sense saber-ho heu sigut participants del meu projecte i el meu camí. Moltes gràcies amics! Pi, Titus, Neus, Aleix, Meritxell, Montse, Laura, Olga, Eva, Laia, Teti, Tubby, Skirol, Guillem, Marimon, Duran, Llums, Makina i tants d’altres... que a dia d’avui potser no ens veiem tant com abans, però que m’heu ajudat sens dubte a construir aquest projecte! Pi, moltes gràcies per la teva ajuda 2.0 en la confecció de la web “<http://familiapomodoro.cat/Rgr/>” tant debò hagués acudit a tu abans amb el problema d’anàlisi dels resultats... Moltes gràcies pel temps dedicat, però sobretot per ser-hi!

Sobretot, gràcies a la família. Als meus pares, els veritables arquitectes de les meves il·lusions! Moltes gràcies per la confiança incondicional i tot el suport i ajuda que m’heu donat. Ara que han passat uns quants anys és quan reconec i valoro realment les hores que he passat darrera al taulell de la carnisseria al vostre costat. Moltes gràcies pels valors i motivacions que m’heu transmès. Gràcies per ser com sou! Aida, aquesta tesi també és gràcies a tu! m’has ajudat molt únicament sent-hi i estimant-me! A la resta de família de Castellbisbal i Vilafranca, moltes gràcies per tota l’estima i ajuda d’aquests anys!

Mina, moltes gràcies per ajudar-me a arribar fins aquí. Sense la teva ajuda i paciència hagués estat molt complicat. Ets qui més ha hagut de patir i aguantar aquest projecte, gràcies!. Sempre has confiat en mi i m’has animat en els moments fluixos. Tant debò tinguem sort i puguem començar aquest nova etapa que tanta il·lusió ens fa. Gràcies per ser-hi sempre, compartir-ho tot i fer-me feliç. T’estimo.

CARACTERITZACIÓ DE L'OPERACIÓ I ESTUDI
METATRANSCRIPTÒMIC D'UN BIOREACTOR DE
DESSULFURACIÓ D'ALTA CÀRREGA D'H₂S

ÍNDIX DE CONTINGUTS

0. Marc de la tesi, motivacions i objectius generals	1
0.1 Interès i motivacions de recerca	3
0.2 Objectius de recerca	3
0.3 Resum de continguts	4
1. Introducció general	7
1.1 Introducció al tractament de gasos contaminats	9
1.1.1 El sulfur d'hidrogen i fonts emissores	10
1.1.2 Propietats fisico-químiques i toxicitat biològica	12
1.1.3 Cicle biològic del sofre	13
1.1.4 Tecnologies de tractament d'emissions gasoses.	16
1.1.4.1 Sistemes de tractament fisicoquímic per a la dessulfuració de gasos	17
1.1.4.2 Sistemes de tractament biològic per a la dessulfuració de gasos	18
i. Biofiltres	19
ii. Biofiltres percoladors	20
iii. Biorentadors	22
iv. Definicions per a la biofiltració	23
1.2 Bacteris sulfur-oxidants	24
1.2.1 Models metabòlics d'oxidació de compostos de sofre	26
i. Via d'oxidació de tiosulfat ramificada	26
ii. Via d'oxidació del tetratió	28
iii. Via d'oxidació del complex multi-enzimàtic Sox	29
iv. Vies oxidatives particulars dels bacteris verds del sofre	31
1.3 Tècniques de biologia molecular per a l'estudi de comunitats microbianes	32
1.3.1 Fonaments i aplicacions de marcadors filogenètics moleculars	32
1.3.2 Clonatge i seqüenciació dels gens 16S rRNA	34
1.3.3 Hibridació <i>in situ</i> per fluorescència (FISH)	36
1.3.4 Alternatives resolutives en l'estudi de marcadors filogenètics moleculars	39
i. Electroforesis en gel amb gradient desnaturalitzant (DGGE)	39
ii. Polimorfisme de conformació de cadena única (SSCP)	41
iii. Anàlisi de restricció del DNA ribosomal amplificat (ARDRA)	41
iv. Polimorfisme de longitud dels fragments de restricció terminals (T-RFLP)	42
v. Anàlisi dels espaiadors intergènics ribosomals (RISA)	43

1.4 Anàlisis "bio-òmiques" per a l'estudi de comunitats microbianes complexes	43
1.4.1 Tecnologies de seqüenciació de nova generació	44
1.4.2 Bases de dades i bioinformàtica	53
1.5 Referències	55
2. Operació i monitoratge d'un biofiltre percolador de dessulfuració d'alta càrrega d'H₂S	65
2.1 Introducció	67
2.2 Antecedents	69
2.3 Objectius	69
2.4 Materials i mètodes	70
2.4.1 Muntatge experimental	70
2.4.2 Mètodes analítics	72
2.4.3 Inoculació i posada en marxa	73
2.4.4 Tests experimentals	73
2.5 Resultats i discussió	75
2.5.1 Inoculació i posada en marxa	75
2.5.2 Efecte de la càrrega d'oxigen en l'operació del biofiltre	78
2.5.3 Operació estacionària i mostreigs de biomassa	81
2.6 Conclusions	83
2.7 Referències	84
3. Estudi de les comunitats microbianes del biofiltre percolador de dessulfuració d'alta càrrega de H₂S, mitjançant tècniques de biologia molecular	87
3.1 Introducció	89
3.2 Objectius	92
3.3 Materials i mètodes	93
3.3.1 Llibreries de clons dels gens 16S rRNA	93
3.3.1.1 Muntatge experimental	93
3.3.1.2 Mostreigs de biomassa	94
3.3.1.3 Extracció de DNA i amplificació dels gens 16S rRNA	94
3.3.1.4 Electroforesi en gel d'agarosa i espectrofotòmetre UV	95
3.3.1.5 Construcció de les llibreries de clons	96
3.3.1.6 Extracció de DNA plasmídic i seqüenciació	97
3.3.1.7 Anàlisi bioinformàtica de les seqüències	98
3.3.1.8 Nombres d'accés de les seqüències de nucleòtids	102
3.3.2 Hibridació <i>in situ</i> per fluorescència pel seguiment de poblacions microbianes	103
3.3.2.1 Muntatge experimental	103
3.3.2.2 Mostreigs de biomassa	103

3.3.2.3 Hibridació <i>in situ</i> per fluorescència (FISH)	104
3.4 Resultats i discussió	108
3.4.1 Caracterització de les comunitats bacterianes mitjançant la construcció de llibreries de clons per els gens 16S rRNA	108
3.4.1.1 Posada en marxa i operació del biofiltre percolador	109
3.4.1.2 Llibreries de clons dels gens 16S rRNA	110
3.4.1.3 Diversitat filogenètica i evolució de les poblacions sulfur-oxidants	112
3.4.2 Seguiment de poblacions sulfur-oxidants per FISH	118
3.4.2.1 Posada en marxa i operació del biofiltre percolador	118
3.4.2.2 Determinació de la dinàmica de poblacions sulfur-oxidants mitjançant la tècnica FISH	119
3.5 Conclusions	125
3.6 Referències	126
4. Desenvolupament metodològic per a l'estudi del metatranscriptoma d'un biofiltre percolador de dessulfuració d'alta càrrega d'H₂S	133
4.1 Introducció	135
4.2 Antecedents	138
4.3 Objectius	138
4.4 Materials i mètodes	139
4.4.1 Muntatge Experimental	139
4.4.2 Mostreigs de Biomassa	139
4.4.3 Extracció de RNA total	140
4.4.4 Tractament amb DNasa i purificació del mRNA	140
4.4.5 Preparació de la llibreria de cDNA	141
4.4.6 Electroforesi capil·lar i espectrofotòmetre UV	143
4.4.7 PCR en emulsió	143
4.4.8 Piroseqüenciació	145
4.5 Resultats i discussió	145
4.5.1 Extracció de RNA	145
4.5.2 Enriquiment i purificació del mRNA	148
4.5.3 Metodologia de preparació de la llibreria de cDNA	150
4.5.4 Piroseqüenciació	154
4.6 Conclusions	156
4.7 Referències	157

5. Anàlisi Bioinformàtica i interpretació dels resultats de l'estudi metatranscriptòmic del bioreactor de dessulfuració d'alta càrrega d'H₂S	159
5.1 Introducció	161
5.2 Antecedents	164
5.3 Objectius	165
5.4 Materials i mètodes	166
5.4.1 Assemblatge de seqüències	166
5.4.2 Classificació, filtratge i anàlisi	167
5.4.3 Anotació filogenètica i funcional	168
5.5 Resultats i discussió	169
5.5.1 Assemblatge de seqüències i classificació	169
5.5.2 Grau d'expressió i expressió diferencial	171
5.5.3 Anotació i caracterització funcional	174
5.6 Conclusions	179
5.7 Referències	180
6. Conclusions generals i treballs futurs	185
6.1 Conclusions generals	187
6.2 Treballs Futurs	189
7. Annex	191

**CAPÍTOL 0 MARC DE LA TESI, MOTIVACIONS I OBJECTIUS
GENERALS**

0.1 INTERÈS I MOTIVACIONS DE RECERCA

El sulfur d'hidrogen (H_2S) és un dels compostos reduïts de sofre més freqüents en les emissions gasoses d'una gran varietat d'indústries. Durant les últimes dècades els sistemes de tractament biològic han esdevingut una alternativa eficient i rendible en aquest sentit. Centrant l'estudi al voltant d'un biofiltre percolador per a la dessulfuració d'alta càrrega d' H_2S , es planteja l'estudi i caracterització de les comunitats microbianes com a components actius que es desenvolupen en aquestes biotecnologies. Històricament, aquests bioprocessos han estat àmpliament estudiats des del punt de vista de procés, experimentant i optimitzant la tecnologia des d'aspectes operacionals, considerant la part biòtica d'aquests sistemes com una caixa negra de composició i mecanismes desconeguts.

Així doncs, la motivació d'aquesta tesi es centra en l'estudi de la biodiversitat i activitat microbiana d'aquests bioreactors de dessulfuració, ja que l'optimització i millora del disseny d'aquests sistemes passa, sens dubte, per l'estudi i caracterització dels que són els biocatalitzadors reals d'aquests processos. Amb aquesta intenció es planteja l'aplicació de tècniques de biologia molecular per a la identificació i seguiment de les espècies presents, a més de proposar l'aplicació de les noves plataformes de seqüenciació de DNA com una potent eina per a l'anàlisi integral de les comunitats microbianes que es desenvolupen en aquests bioprocessos.

0.2 OBJECTIUS DE RECERCA

A partir de les motivacions plantejades i amb intenció d'aprofundir en el coneixement de les comunitats microbianes al voltant de la biodesulfuració d'alta càrrega d' H_2S es proposen els següents objectius generals:

- En base al coneixement acumulat al voltant de l'operació del biofiltre percolador de dessulfuració d'alta càrrega d' H_2S , es planteja la posada en marxa i operació del sistema amb un nou material de rebliment desordenat, concretament anelles Pall de 10 mm de diàmetre. Conseqüentment l'optimització dels paràmetres operacionals esdevenen objectius parcials d'aquest treball.
- Complementant el coneixement acumulat al voltant de l'operació, es planteja la construcció de dues llibreries gèniques de 16S rRNA a partir de la biomassa desenvolupada en el biofiltre. A partir de la identificació realitzada en base al clonatge i seqüenciació dels gens de 16S rRNA, es planteja el

- seguiment d'algunes de les espècies identificades amb capacitat sulfur-oxidant, mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ per* fluorescència (FISH).
- Amb la motivació final de presentar una anàlisi global dels gens que s'estan expressant en les comunitats microbiològiques presents en el bioreactor, es planteja i s'aplica una metodologia experimental per a poder realitzar un estudi metatranscriptòmic del biofiltre percolador tractant altes càrregues de H₂S.
 - Amb l'objectiu final de realitzar una anàlisi comparativa a nivell d'expressió gènica entre les zones alta, mitja i baixa del biofiltre es planteja la quantificació dels nivells d'expressió dels respectius gens obtinguts en cada una de les zones. Així doncs, en base a l'anàlisi bioinformàtica i la interpretació de les dades resultants es busca descriure l'activitat metabòlica global del procés, amb intenció d'aprofundir en el coneixement biològic d'aquests sistemes de dessulfuració d'alta càrrega d'H₂S.

0.3 RESUM DE CONTINGUTS

Aquest apartat és un resum general del seguit de capítols que estructuraran aquesta tesi doctoral. Així doncs, inicialment es presenta una àmplia introducció general relacionada amb les motivacions i objectius d'estudi d'aquesta tesi amb intenció de contextualitzar el projecte desenvolupat. En aquest sentit es presenta una revisió bibliogràfica al voltant dels sistemes de tractament de gasos contaminants, centrant la introducció en el contaminant d'estudi, l'H₂S, i els sistemes de tractament biològic. De manera similar, es presenta un apartat introductori al voltant dels bacteris sulfur-oxidants i els diferents models metabòlics d'oxidació de compostos de sofre coneguts. Complementant aquesta part, es fa un recull descriptiu de diferents tècniques de biologia molecular, basades en marcadors filogenètics moleculars, per a l'estudi de comunitats microbianes. Per últim, es presenta una revisió de les diferents tecnologies de seqüenciació de DNA de nova generació amb la intenció d'introduir i fonamentar l'aproximació bio-òmica per a l'estudi de comunitats microbianes complexes.

Seguidament en el segon capítol d'aquesta tesi, es desenvolupa un primer estudi al voltant de la posada en marxa i operació del biofiltre percolador de dessulfuració d'alta càrrega d'H₂S, mitjançant la configuració d'un nou material de rebliment inorgànic desordenat. En base al monitoratge de diferents paràmetres, s'aconsegueix optimitzar el règim d'operació establint unes noves condicions d'operació que minimitzen la generació de sofre inorgànic en el bioreactor.

En el tercer capítol, i com a aproximació inicial en l'estudi de les comunitats microbianes del bioreactor, es construeixen per a dos moments operacionals separats en el temps, dues llibreries gèniques de 16S rRNA. A partir dels resultats de les llibreries de clons construïdes, per seqüenciació del gen 16S rRNA i la comparació amb les bases de dades s'identifiquen les diferents espècies microbianes que es desenvolupen en el biofiltre, permetent descriure la diversitat filogenètica existent en aquests bioprocessos. En base a la identificació d'espècies realitzada, es seleccionen diverses espècies microbianes sulfur-oxidants amb intenció d'estudiar la seva adaptació i dinàmica al llarg de l'operació. Mitjançant la tècnica FISH es visualitzen i quantifiquen aquestes espècies sulfur-oxidants, realitzant un seguiment a diferents altures del cos del bioreactor permetent analitzar la dinàmica poblacional dels microorganismes hibridats. Els resultats obtinguts demostren una clara especialització i simplificació de les comunitats existents al llarg del temps en les diferents zones del biofiltre. A més, permeten relacionar aspectes operacionals del bioreactor, com per exemple els gradients d'O₂ i H₂S al llarg del biofiltre, amb el metabolisme específic del diferents grups de microorganismes estudiats.

Complementant l'estudi realitzat per a la caracterització i el seguiment de poblacions microbianes, en el capítol quatre d'aquesta tesi es descriu el procés d'optimització de la metodologia necessària per a la realització de l'estudi metatranscriptòmic de les comunitats microbianes del biofitre. Tot i l'existència d'un protocol comercial definit, per a l'estudi metatranscriptòmic va ser necessària l'optimització de cada una de les etapes de preparació degut a les característiques de la biomassa estudiada. En aquest capítol es descriuen, per als diferents processos experimentals aplicats i implementats, els resultats obtinguts amb l'objectiu d'optimitzar els rendiments d'extracció i purificació de mRNA. Finalment, assolits els rendiments necessaris tant en termes de quantitat com de qualitat, es presenta el protocol optimitzat per a la preparació de les mostres seqüenciades en la plataforma GS FLX de Roche&454.

Finalment en l'estudi metatranscriptòmic presentat en el capítol cinc, es processen tres mostres corresponents a diferents zones del biofiltre, de manera similar als estudis de FISH realitzats en el capítol tres. Tot i ser seqüenciades en una mateixa reacció de piroseqüenciació, cada una de les mostres és processada i analitzada independentment. Pel tractament de les dades obtingudes, inicialment s'apliquen diferents estratègies d'assemblatge de les lectures amb intenció d'optimitzar el càlcul d'assemblatge. Mitjançant l'anàlisi bioinformàtica es realitza la interpretació del metatranscriptoma referit a cada una de les zones de mostreig. Amb aquest objectiu, es quantifiquen els nivells d'expressió per a cada un dels contigs generats permetent l'anàlisi comparativa del grau d'expressió dels gens del biofiltre a diferents altures.

Segons els resultats presentats, s'observa una clara expressió diferencial associable a les diferents condicions ambientals pròpies de cada zona del bioreactor. Paral·lelament, mitjançant l'anàlisi bioinformàtica es realitza una cerca per similitud dels contigs assemblats en diferents bases de dades específiques en busca d'una anotació funcional pels transcrits identificats. Amb intenció d'ampliar l'anotació funcional resultant del metatranscriptoma es presenta la caracterització dels contigs obtinguts mitjançant l'anàlisi ontològica d'aquests. En aquest sentit, l'enorme volum d'informació de seqüència generada, es presenta com la descripció de l'expressió gènica global referida a diferents zones del bioreactor de dessulfuració d'alta càrrega d'H₂S.

Finalment, en l'últim capítol de la tesi es presenta un recull de les conclusions generals assolides en aquest treball, així com una descripció dels possibles treballs continuadors d'aquesta tesi.

CAPÍTOL 1 INTRODUCCIÓ GENERAL

1.1. INTRODUCCIÓ AL TRACTAMENT DE GASOS CONTAMINATS

Albert Einstein (1879-1955) teoritzant sobre el medi ambient, el va definir com a “*tot allò que no sóc jo*”. Aquesta senzilla definició és interessant no únicament pel seu ampli espectre sinó perquè també ens considera i implica a cada un de nosaltres com a individus i ambient. Aquesta responsabilitat adjudicada l’hem estat defugint durant dècades al mateix temps que la industrialització de les societats, augmentava el nombre i quantitat de contaminants que s’aboquen al medi ambient, tant en fase sòlida, com líquida i gas. Avui en dia la contaminació atmosfèrica representa un dels principals reptes ambientals de la nostra societat, especialment a les grans metròpolis i en les zones industrials, on els problemes de contaminació de l’aire han arribat a nivells amenaçadors per a la salut humana i ambiental.

Malgrat que les alteracions de la composició de l’aire atmosfèric poden ser originades per emissions naturals com ara les erupcions volcàniques, els incendis forestals, o la degradació natural de matèria orgànica, aquestes fonts han estat presents en l’atmosfera del planeta durant mil·lennis com a components naturals de la pròpia dinàmica atmosfèrica. En aquest sentit, és interessant destacar la generació de certs contaminants com el sulfur d’hidrogen (H_2S), alguns compostos de nitrogen, hidrocarburs o monòxid de carboni (CO), entre d’altres, degut al fet que presenten una generació anual marcadament superior per a fonts naturals que no pas per a fonts d’origen antropogènic (Kennes i Veiga 2001). No obstant, la totalitat d’emissions antropogèniques resulten molt més nocives i amenaçadores degut a que solen ser emissions intensives i localitzades durant períodes de temps prolongats.

Les emissions contaminants d’origen antropogènic poden ser classificades, generalment, en fonts estacionàries i fonts mòbils. Les fonts estacionàries engloben les diferents emissions domèstiques, principalment sistemes de calefacció, a més de les emissions industrials alliberadores d’una gran quantitat de contaminants a través de processos de combustió i altres tipologies de gasos residuals. En canvi les fonts mòbils consideren tota la tipologia d’emissions derivades dels sistemes de transport com vehicles, avions i vaixells, entre d’altres. Respecte les diverses tecnologies de tractament d’emissions gasoses, es diferencien els sistemes de tractament fisicoquímic i els sistemes de tractament biològic. Tradicionalment, les estratègies més implementades per al tractament de gasos contaminats han estat els sistemes fisicoquímics, no obstant, en moltes ocasions, els costos associats a aquestes tecnologies solen ser molt elevats. En aquest sentit els sistemes de tractament biològic apareixen com una estratègia eficient per al tractament d’emissions gasoses de fonts estacionàries (Devinny *et al.*, 1999). Els tres tipus bàsics de bioreactors

utilitzats en el tractament biològic de gasos contaminants són els biofiltres convencionals, els biofiltres percoladors i els bioentadors. L'elecció del sistema de tractament més adequat per a cada situació depèn de diversos factors com el cabal d'aire a tractar, els nivells d'eliminació requerits, els costos de tractament i, evidentment, la naturalesa dels contaminants a tractar així com la seva concentració.

1.1.1 EL SULFUR D'HIDROGEN I FONTS EMISSORES

Existeixen una gran quantitat de processos industrials generadors d'efluents gasosos amb presència de contaminants sulfurosos. En aquest sentit dues de les indústries més importants en quant a la generació d'H₂S són les refineries de petroli i les indústries del carbó. En certs casos, les quantitats d'H₂S produïdes són tant importants que, enlloc de ser tractades com un contaminant a descartar, són considerades com un valuós subproducte que és convertit a sofre pel procés d'oxidació de Claus (Weil *et al*, 2006) per tal de valoritzar la seva generació. Per altre costat, els gasos combustibles (gas natural, gas de síntesi, biogàs, gasos geotèrmics, etc) també poden contenir importants quantitats de H₂S i grups tiols (R-SH), per aquesta raó solen ser dessulfurats prèviament a les etapes de generació d'energia, ja que la combustió d'aquests gasos implicaria l'alliberació de grans quantitats de SO₂, a més de corroure la maquinària i els motors de combustió. El contingut de H₂S al gas natural pot variar de zero a més del 35% v v⁻¹ (350.000 ppm_v). Normalment les especificacions tècniques de les canonades pel transport de gas natural limita el contingut de H₂S a nivells inferiors al 0.0004%v v⁻¹ (4 ppm_v o 5.7 mg m⁻³) (Woodcock i Gotlieb, 2004).

Un altre grup d'empreses relacionades amb el sofre són aquelles generadores de corrents tant líquids com gasosos que contenen importants quantitats de compostos reduïts de sofre com a resultat dels processos de producció (taula 1.1). En general, la utilització d'àcid sulfúric o matèries primeres riques en sulfat en processos de producció resulta, en la majoria dels casos, en la generació de corrents líquids residuals altament rics en sulfats (Lens *et al.*, 2004).

La mineria de metalls pesats i la producció de carbó genera aigües residuals altament riques en sulfats i pobres en matèria orgànica, les quals són un important problema de contaminació en països amb gran activitat minera. No obstant, les indústries papereres i processadores d'aliments també generen aigües residuals que presenten grans concentracions de sulfat però també contenen altes càrregues de matèria orgànica, les quals són normalment tractades per digestió anaeròbia. En condicions anaeròbies els bacteris reductors de sulfat són capaços d'utilitzar el sulfat com a

acceptor final d'electrons per a la degradació de matèria orgànica, generant sulfur com a producte.

Taula 1.1 Exemple de compostos reduïts de sofre presents en corrents de gasos residuals (Herrygers *et al.*, 2004). DMS, C₂H₆S ; MT, CH₃SH; DMDS, C₂H₆S₂; DMTS, C₂H₆S₃; COS, OCS.

Procés	Compostos reduïts de sofre	Concentració (ppm _v)
Biotractaments de la fracció orgànica		
Tractament de les aigües residuals d'indústries cerveseres	H ₂ S	4
	DMS	30
Producció compost pel cultiu de xampinyons	H ₂ S, CS ₂ , MT, DMS, DMDS DMTS, COS	0.024-0.84
Instal·lacions de compostatge de fangs de depuradora	DMS, DMDS	10
Processos d'altres temperatures		
Cuina industrial d'aliments	H ₂ S	<800
	MT	<200
Tractament tèrmic de fangs	NH ₃ , Dimetil-tiol	n.d.
	H ₂ S, MT, DMS, DMDS, tiofens, pirazines, indols	n.d.
Processos industrials		
Fabricació seda artificial	H ₂ S, CS ₂	20-1000
Producció de paper (procés Kraft)	MT	94
	DMS	16.6
	DMDS	21.7

La digestió anaeròbica generalment resulta en la formació de dos corrents, un corrent digerit sòlid o líquid, amb una càrrega orgànica molt inferior a l'inicial i un corrent de gas conegut com a biogàs. El biogàs està compost principalment per metà (CH₄; 60-70% v v⁻¹) i diòxid de carboni (CO₂; 30-40% v v⁻¹), tot i que també conté petites traces d'hidrogen, H₂S, amoni, tiols, siloxans, etc. que poden arribar a representar del 1-5% v v⁻¹ del biogàs (Walsh *et al.*, 1988).

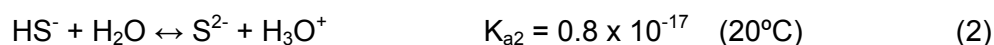
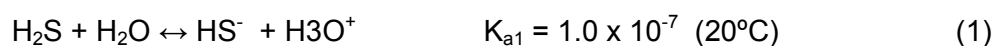
El H₂S i altres compostos reduïts de sofre són algunes de les impureses més abundants en el biogàs provinents de la fermentació de molècules orgàniques constituïdes amb sofre com per exemple algunes proteïnes (Abatzoglou i Bovin, 2009). Típicament el contingut de H₂S en el biogàs varia del 0.1 al 0.5% v v⁻¹ (1000-5000 ppm_v), tot i que valors inferiors a 0.0002% i majors al 2% també han sigut observats (Walsh *et al.*, 1988). Altes concentracions de sulfur poden causar corrosió dels digestors i acumulació de metalls sulfurosos amb un alt potencial tòxic (Lens *et al.*, 2004).

La dependència energètica actual de les societats desenvolupades, on els combustibles fòssils són cada vegada més escassos, ha fet de la recuperació energètica de biogàs un procés cada vegada més comú. El biogàs es pot considerar com un subproducte més en molts processos industrials, de manera que pot reduir significativament els costos operacionals fins al punt de convertir-se en una font d'ingressos més. En aquests casos, la puresa del biogàs és essencial, i el H₂S i altres

compostos reduïts de sofre han de ser eliminats prèviament a la combustió per tal d'evitar problemes de corrosió i toxicitat. En aquest sentit, els sistemes de tractament biològic es presenten com una eficient tecnologia per a l'eliminació d'aquests tipus d'impureses en el biogàs generat (Fortuny *et al.*, 2008).

1.1.2 PROPIETATS FÍSICOQUÍMIQUES I TOXICITAT BIOLÒGICA

El sulfur d'hidrogen és un àcid dèbil que a temperatura ambient i a pressió atmosfèrica es presenta en estat gasós (punt d'ebullició -60.7°C). Té una solubilitat en aigua de 4.000mg L⁻¹ H₂O a 20°C i 1.013 bar (Stuedel, 2004), de manera que és unes 400 vegades més soluble que l'oxigen en aigua (9.1 mg L⁻¹ a 20°C). En solució aquosa, l'estat de desprotonació depèn del pH de la solució seguint les equacions 1 i 2 (Stuedel, 2004).



És un gas altament tòxic que mostra un llindar de detecció olfatiu molt baix (taula 1.2) fàcilment reconeixible per la seva olor d'ous podrits. Quan s'assoleixen concentracions per sobre de les 100 ppm, el sentit de l'olfacte queda insensibilitzat donant una falsa sensació de seguretat (Weil *et al.*, 2006) fet que genera una important perillositat, en termes de toxicitat biològica, durant la seva manipulació.

Taula 1.2. Efectes sobre la salut humana, per diferents concentracions de sulfur d'hidrogen (CICAD 53, 2003)

[H ₂ S] mg/m ³	Efecte/Observació	Referència
0.011	Llindar d'olor	Amoore i Hautala, 1983
2.8	Constricció Bronquial en persones asmàtiques	Jappinen <i>et al.</i> , 1990
5.0	Dolències als ulls	Vanhoorne <i>et al.</i> , 1995
7-14	Augment de la concentració de lactat en sang, disminució de l'activitat <i>citrat sintasa</i> i disminució de la capacitat de captació d'oxigen	Bhambhani i Singh, 1991; Bhambhani <i>et al.</i> , 1996, 1997
5-29	Irritació ocular i pulmonar	IPCS, 1981
28	Fatiga, mal de cap, irritabilitat, mala memòria, mareig	Ahlborg G, 1951
>140	Paràlisi olfactiva	Hirsch i Zavala, 1999
>560	Aflicció respiratòria, pèrdua de consciència	Spolyar, 1951
≥700	Mort	Beauchamp <i>et al.</i> , 1984

El sulfur d'hidrogen anhidre en general presenta una baixa corrosivitat, contraposadament a quan es troba en ambients humits en que pot arribar a corrore 2.5 mm/any en acers al carboni. A més a més, pot generar esquerdes per estrès de sulfur en diversos metalls (Weil *et al.*, 2006). El sulfur d'hidrogen també és responsable de la corrosió d'estructures de formigó com el clavegueram, ja que els bacteris sulfur-oxidants oxiden el sulfur d'hidrogen a àcid sulfúric. Els àcids forts

reaccionen amb els minerals alcalins que constitueixen el formigó, fet que en debilita la seva integritat estructural.

A l'hora de manipular i treballar amb aquest gas s'han de seguir tot un seguit de precaucions i metodologies per tal de garantir la seguretat. A part de la corrosivitat i toxicitat biològica, el sulfur d'hidrogen és un gas extremadament inflamable quan es mescla amb aire dins el rang de proporcions de 4.3% al 46% v v⁻¹ en aire (Air Liquid H₂S safety data sheet, Air Liquid France), ja que amb aquestes proporcions es forma una mescla altament explosiva.

1.1.3 CICLE BIOLÒGIC DEL SOFRE

El sofre (S°) és el catorzè element més abundant a l'escorça de la Terra i es troba àmpliament distribuït, tant en forma lliure com combinada. Dins del planeta segueix un cicle biogeoquímic amb diferents formes possibles, que interaccionen amb els components biòtics i abiòtics dels ecosistemes. L'estat d'oxidació del sofre pot presentar-se des de +2 fins a -6, sent un element altament reactiu i versàtil dins el seu cicle. És un element metàl·lic essencial per a la vida, ja que és present en diferents molècules orgàniques com: aminoàcids, cofactors, enzims, hormones o proteïnes. Tot i així la majoria del sofre terrestre es troba present en roques i minerals de l'escorça, a més de les sals de sulfat acumulades als fons oceànics (Middelburg, 2004). Per altre costat, el cicle del sofre es desenvolupa parcialment a l'atmosfera en forma de gasos sulfurosos com són el sulfur d'hidrogen (H₂S), els òxids de sofre (SO_x) i altres compostos orgànics volàtils de sofre (COVs) (Middelburg, 2004).

Com tots els cicles d'elements, el del sofre presenta una part oxidant i una part reductora que, en la majoria d'ecosistemes, estan en equilibri. Tot i així, en certs ambients l'equilibri no es produeix, causant l'acumulació d'intermedis com el sofre, els sulfurs de ferro o l'àcid sulfhídric entre d'altres. Interaccionant amb el cicle existeixen una gran diversitat de procariotes que utilitzen les diferents formes reduïdes i/o oxidades del sofre com a font d'energia per al seu creixement (fig. 1.1).

Alguns dels compostos inorgànics de sofre més comuns en ambients naturals són el sulfur, els polisulfurs, el tiosulfat, els politionats, el sofre elemental, els bisulfits i el sulfat. Aquests compostos poden ser utilitzats pels microorganismes de forma assimilatòria o dissimilatòria. Els compostos de sofre actuen d'intermediaris en els processos redox acceptant o cedint electrons en funció del seu estat d'oxidació.

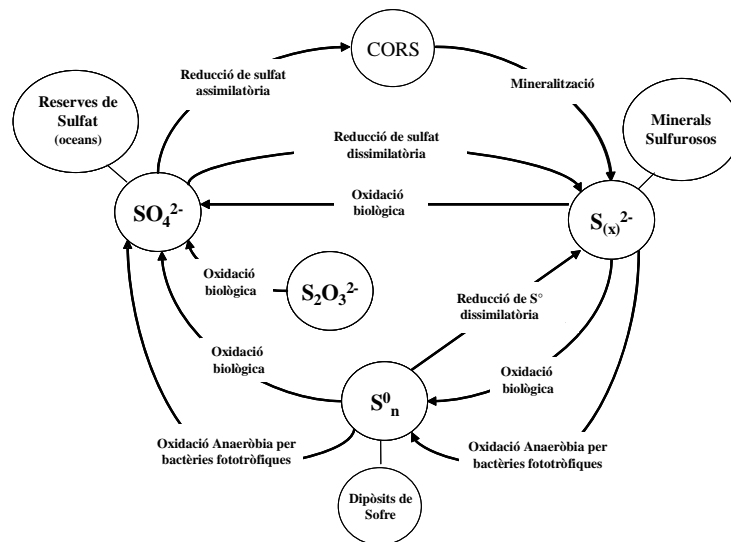


Figura 1.1 Cicle biològic del sofre (adaptat de Robertson i Kuenen, 1999). CORS: Compostos Orgànics Reduïts de Sofre. Les reaccions d'oxidació biològica es poden dur a terme per una àmplia diversitat d'espècies utilitzant O₂ o NO₃⁻.

El sulfur i el sulfat, com a resultat de no poder ser més reduït i oxidat respectivament, són freqüentment els productes finals de les vies d'oxidació-reducció de compostos de sofre. Els estats d'oxidació dels compostos inorgànics de sofre amb rellevància biològica es mostren llistats a la taula 1.3. Des d'un punt de vista biològic, les vies dissimilatòries generen importants quantitats de compostos de sofre, de manera que els productes finals són alliberats al medi ambient. Tot i així, el trencament d'aquestes rutes redox pot succeir, resultant en la formació i secreció de compostos de sofre en un estat d'oxidació intermedi. Oposadament, les vies metabòliques assimilatòries generen menors quantitats de compostos de sofre i majoritàriament el sofre o els seus derivats són incorporats a molècules orgàniques.

El sulfur és format com a producte principal de la respiració del sulfat per part de bacteris anaeròbics en condicions no limitants de matèria orgànica i sulfat. Altres compostos com el tiosulfat i el sofre elemental també poden servir com a acceptors d'electrons i conduir a la generació de sulfur. La dessulfuració de compostos orgànics com proteïnes també causa l'alliberació de sulfur. Altres fonts de sulfur importants són els minerals i roques així com les aigües sulfuroses, en aquest context la biolixiviació permet la oxidació de minerals (ex. pirita) per part de bacteris quimiolitautòtrofs (Schippers i Sand, 1999).

El tiosulfat pot ser generat per reaccions no biològiques de sulfit amb sulfur o politionats després d'una etapa d'oxidació incompleta (Schmidt, 1984). Un altre origen de tiosulfat és la lixiviació de metalls sulfurosos com el FeS₂, el MoS₂ o el WS₂ (Schippers i Sand, 1999). Per altre banda la formació de tiosulfat per reaccions biològiques és coneguda, tot i que les vies de generació no estan definides ni

relacionades amb les grans quantitats de tiosulfat lliure en habitats naturals. Tot i així, el tiosulfat apareix com un component important en el cicle biològic del sofre ja que la majoria de bacteris sulfur-oxidants i bona part dels sulfat-reductors són capaços d'acceptar el tiosulfat com a substrat (Barret i Clark, 1987).

Taula 1.3. Compostos de sofre inorgànics amb rellevància biològica.

Compost	Formula química	Estat d'oxidació sofre
Sulfur	HS^-	-2
Polisulfurs	$^-\text{S}(\text{S})_n\text{S}^-$	-1 (S terminal) / 0 (S intern)
Tiosulfat	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	-1 (S sulfan) / +5 (S sulfona)
Politionats	$^-\text{O}_3\text{S}(\text{S})_n\text{SO}_3^-$	0 (S intern) / +5 (S sulfona)
Sofre elemental	anells S_n	0
Bisulfit	HSO_3^-	+4
Sulfat	SO_4^{2-}	+6

El sofre elemental es pot generar degut a l'activitat de certs bacteris sulfur-oxidants. En algunes espècies el sofre elemental és el producte final d'oxidació, permeten la sintròfia d'altres bacteris que el puguin metabolitzar. Algunes espècies de les famílies Chlorobiaceae, Chloroflexaceae i Ectothiorhodospiraceae poden formar glòbuls extracel·lulars de sofre elemental com a intermedis en l'oxidació de compostos de sofre a sulfat. Algunes espècies del gènere *Thiobacillus*, durant el seu creixement en cultius discontinus en condicions d'oxigen limitant, causen la precipitació de sofre elemental (Kelly i Harrison, 1989). La generació de sofre elemental en aquests casos es relaciona amb la oxidació no biològica dels polisulfurs acumulats extracel·lularment, tot i que en cultius en bioreactors aquest fenomen és controlable, el mecanisme de producció de sofre elemental d'aquestes espècies en habitats naturals és encara desconegut.

El sulfat és generat sota condicions aeròbiques des de la majoria de compostos sulfurosos sensibles als processos oxidatius. El procés és accelerat per una gran diversitat de bacteris aeròbics capaços d'oxidar compostos de sofre. En condicions anaeròbiques en canvi, la generació de sulfat es produeix principalment per bacteris fotòtrofs o bé quimioautòtrofs desnitrificants. Els òxids de nitrogen provinents del metabolisme desnitrificant són els únics acceptors d'electrons utilitzats en l'oxidació de compostos de sofre per part de bacteris quimioautòtrofs sota condicions d'anaerobiosi.

El tetracionat també es pot considerar un substrat natural de bacteris sulfur-oxidants. És originat per processos d'oxidació incompleta i alguns grups de bacteris són capaços de generar-lo partint de tiosulfat com a substrat (Barret i Clark, 1987). Els polisulfurs poden ser generats tant per l'obertura reductiva dels anells de sofre elemental com per l'oxidació parcial de sulfurs.

El sulfit és constantment produït en zones d'aigües termals on és reduït a sulfur per arqueobacteris termofílics com *Pyrobaculum islandicum*. La reducció de sulfit es considera una via metabòlica primitiva comparada amb l'oxidació del mateix compost, ja que una gran varietat de bacteris són capaços d'oxidar el sulfit, fins al punt d'especialitzar-s'hi com les espècies de *Sulfitobacter*. Tot i així, el sulfit és un compost intermedi en la majoria de vies metabòliques d'oxidació-reducció i en alguns casos és expulsat al exterior cel·lular com un producte a descartar.

1.1.4 TECNOLOGIES DE TRACTAMENT D'EMISSIONS GASOSES

Les diferents estratègies per al tractament d'emissions gasoses s'agrupen en dos grans tipologies de tractaments, els sistemes de tractament fisicoquímic i els sistemes de tractament biològic. Tradicionalment, les tecnologies més implementades per al tractament d'aires contaminats han estat sistemes fisicoquímics com: l'absorció, l'adsorció, la condensació, la incineració tèrmica o catalítica, o el tractament amb agents químics, entre d'altres tecnologies. Entre els avantatges que presenten aquesta tipologia de tècniques destaquen la capacitat de tractar amplis rangs de concentració amb elevada eficàcia, independentment de la toxicitat del contaminant (Veiga *et al.*, 1996). No obstant, moltes vegades els costos associats a aquestes tecnologies solen ser importants, tenint en compte que la majoria d'aquests tractaments es limiten a transferir el contaminant d'una fase a una altra, on posteriorment caldrà ser tractat. A l'hora d'escollir el sistema de tractament més idoni per a cada cas, s'han de tenir en compte diversos factors, entre els quals destaquen la naturalesa del contaminant a tractar, la seva concentració, el cabal, els nivells d'eliminació requerits i el cost global del tractament. Tot i així existeixen uns rangs força definits en els que és més recomanable aplicar un o altre tipus de tractament (fig. 1.2).

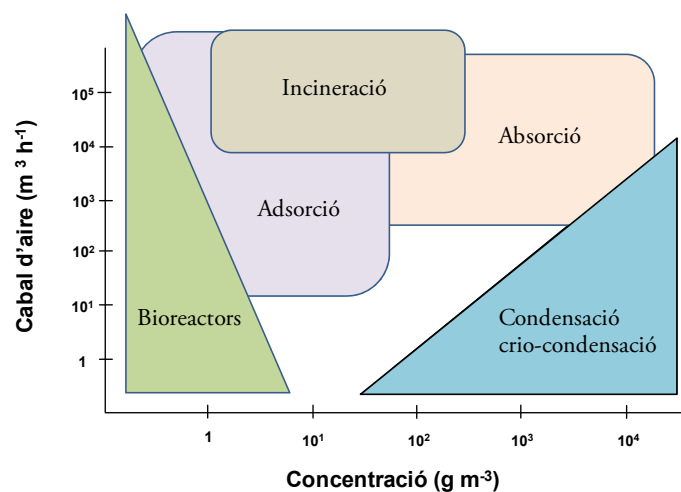


Figura 1.2. Rangs de concentració i cabals aplicables per a diferents tipologies de tractaments d'efluents gasosos. (adaptat de Kennes i Veiga, 2001).

La necessitat d'una tecnologia ambientalment respectuosa i competitiva en el tractament d'efluents gasosos contaminats que es mostrés com una alternativa eficient als tractaments fisicoquímics ha conduït, avui en dia, a la consolidació de les tecnologies basades en bioreactors. Els tres tipus bàsics de bioreactors utilitzats en els tractaments biològics de gasos contaminats són: els biofiltres convencionals, els biofiltres percoladors i els bioentadors.

Aquests sistemes de tractament biològic han demostrat ser funcionalment eficients sota un ampli rang de cabals, sent especialment adients pel tractament de cabals elevats. Tot i així, el rang de concentració de contaminant sobre el que poden actuar és relativament limitat. (Veiga *et al.*, 1996). Segons Devanny *et al.* (1999) les tecnologies biològiques són favorables econòmicament sempre que el cabal d'aire a tractar es trobi entre els 10^3 i els $5 \times 10^4 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ i la concentració de contaminant no sigui major d' $1 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$. No obstant, actualment existeixen bioreactors industrials que operen de forma eficient amb cabals superiors a $10^5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ (Dragt, 1992; Kennes i Thalasso, 1998).

1.1.4.1 SISTEMES DE TRACTAMENT FISICOQUÍMIC PER A LA DESSULFURACIÓ DE GASOS

Els sistemes de tractament fisicoquímics són àmpliament utilitzats en el tractament d'emissions gasoses en general i en la dessulfuració de gasos en particular. La dessulfuració d'un gas mitjançant tecnologies fisicoquímiques es dur a terme principalment per tres vies: l'absorció, l'adsorció o la conversió directa dels compostos de sofre.

L'adequada selecció de la tecnologia fisicoquímica més escaient dependrà de diferents factors que hauran de ser valorats. La concentració de contaminant, el cabal de gas a tractar, la naturalesa del gas, el grau d'eliminació requerit i el cost d'instal·lació i d'operació són alguns dels paràmetres que condicionen quin tipus de tractament serà l'òptim per a una situació determinada. Per tant, per a cada cas, serà necessari un estudi específic que conduirà al disseny de la millor tecnologia de tractament possible i, en certs casos, a la combinació de varies tecnologies simultàniament.

Focalitzant els tractaments fisicoquímics per a la dessulfuració, els processos d'absorció química aprofiten l'afinitat del H_2S pels cations metàl·lics ja sigui per l'oxidació del H_2S fins a S° , o bé per captura del sulfur via precipitació de sals metàl·liques. Una altra opció és la captura del sulfur en una solució alcalina (Lagas, 2004). Pel que fa als tractaments basats en processos d'absorció física s'utilitzen

solvents orgànics per capturar els components àcids en funció de les pressions parcials. També existeixen processos d'absorció mixtes anomenats tractaments d'absorció fisicoquímics que utilitzen complementàriament processos químics i físics de manera que s'aconsegueix millors efectes d'absorció d'H₂S (Lagas, 2004). Els tractaments basats en processos d'absorció només separen el contaminant (H₂S) del corrent gas, generant un efluent concentrat que requereix un tractament posterior. La majoria de processos de conversió directa oxiden el H₂S a S⁰ en aire en presència d'un component que és fàcilment oxidat per l'aire i reduït pel H₂S (Lagas, 2004). També existeixen tractaments de conversió directa que utilitzen lligants orgànics o agents quelants que mantenen el ferro en solució evitant la precipitació d'hidròxids de ferro i sulfurs de ferro. En situacions d'alta càrrega de contaminant es poden combinar etapes d'incineració combinades amb oxidació catalítica per formar S⁰. Uns altres tipus de tractaments fisicoquímics per a la dessulfuració de gasos són els basats en processos d'adsorció, en aquests sistemes el contaminant és adsorbit sobre materials de diferents naturaleses, podent ser processos d'adsorció química amb adsorbents com els òxids de zinc o els encenalls de fusta impregnats amb ferro, o bé processos d'adsorció física mitjançant zeolites o carbó actiu (Abatzogolu i Boivin, 2009).

Pràcticament tots els sistemes de tractament fisicoquímics estan compostats per diferents unitats o etapes. Les complicacions operatives i els costos derivats de les diferents etapes poden condicionar l'aplicació d'aquests processos en determinats tractaments de dessulfuració. Per a situacions de dessulfuració a petita escala (<0.6t S d⁻¹), com poden ser les plantes de tractament d'aigües residuals o les plantes de generació de biogàs entre d'altres, les alternatives de tractament biològic són una opció efectiva en augment. El seu baix cost d'inversió i operació comparats amb els dels sistemes de tractament fisicoquímics estan fent augmentar la seva popularitat i la implementació en diversos processos industrials.

1.1.4.2 SISTEMES DE TRACTAMENT BIOLÒGIC PER A LA DESSULFURACIÓ DE GASOS

El tractament biològic d'emissions gasoses resulta una alternativa eficaç i versàtil en la descontaminació de gasos via la degradació o transformació de contaminants fonamentada en l'activitat biològica d'organismes vius, principalment microorganismes. Els estudis recents al voltant d'aquests bioprocessos, han permès augmentar el coneixement i la implementació d'aquest tipus de tractaments a un ampli ventall de compostos orgànics i inorgànics, incloent compostos orgànics volàtils (COVs), amoníac i compostos sulfurosos entre d'altres (Deviny *et al.*, 1999;

Delhomenie i Heitz, 2005). Aquest sistema biològic elimina els contaminants gràcies a l'activitat metabòlica dels microorganismes presents, de forma que el contaminant en qüestió és utilitzat com a font d'energia i/o carboni per les comunitats microbianes que es desenvolupen en cada sistema.

A l'actualitat existeixen principalment tres configuracions de bioreactors per al tractament biològic de gasos: els biofiltres, els biofiltres percoladors i els bioentadors (Devinny *et al.*, 1999; Kennes i Veiga, 2001). En totes les configuracions succeeixen dos processos fonamentals, per un costat la transferència del contaminant des de la fase gas a la fase líquida i posteriorment a la biopel·lícula, i per altre costat la consegüent degradació del contaminant per part dels microorganismes.

L'eficàcia dels sistemes de tractament biològic està condicionada per diferents aspectes i un dels més importants és la naturalesa del contaminant. Els contaminants han de ser biodegradables, solubles en més o menys grau en fase aquosa i no ésser tòxics per a els microorganismes. Altres paràmetres crítics comuns per a totes les tipologies de bioreactors són la temperatura, el pH, el contingut d'humitat i la disponibilitat de nutrients essencials (Kennes i Veiga, 2001).

i. Biofiltres

La biofiltració ha estat una tecnologia extensament implementada per al tractament d'olors de diferents naturaleses. Inicialment es construïen seguint consideracions empíriques, tot i que avui en dia a partir de l'ampli coneixement acumulat se'n desenvolupen diferents configuracions en funció de l'objectiu d'aplicació. En termes generals, un biofiltre convencional (fig. 1.3) consisteix en un reactor empaquetat amb un material de rebliment orgànic com pot ser el compost, la fusta i escorça d'arbres, la torba o bé una mescla d'aquests.

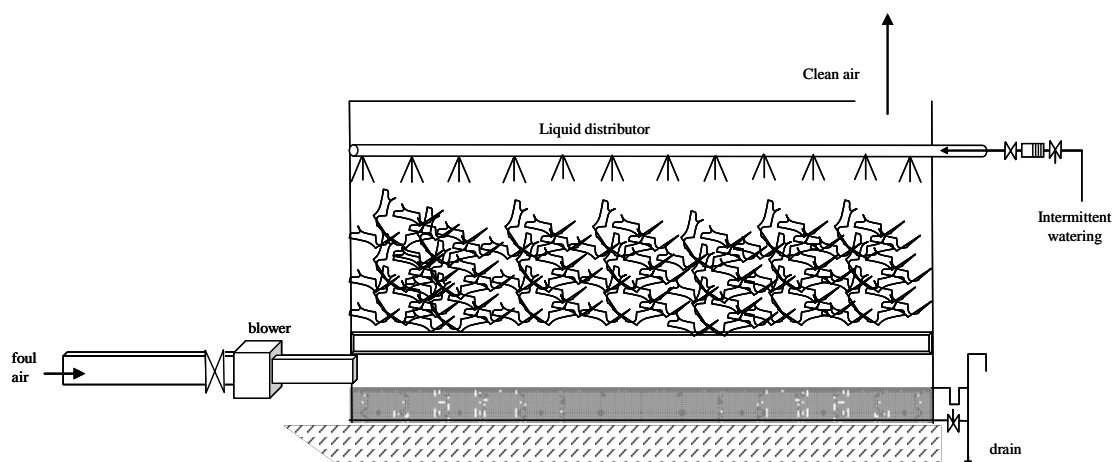


Figura 1.3. Esquema d'un biofiltre convencional.

Prèviament a l'entrada del biofiltre, el corrent de gas contaminat és humidificat per minimitzar la variació del contingut d'humitat del biofiltre. Mitjançant un bufador el gas flueix a través dels porus del llit empaquetat on el contaminant es va transferint a la biopel·lícula. Conjuntament al contaminant, la naturalesa orgànica del material de rebliment aporta l'extra de nutrients necessaris per al creixement. Tot i així, per tal d'assegurar un suficient contingut d'humitat del biofiltre i rentar possibles productes inhibitoris (Delhomenie *et al.*, 2003), s'apliquen recs periòdics d'aigua. Puntualment i de manera complementària es poden aportar, conjuntament amb l'aigua del rec, diferents micronutrients per tal d'afavorir l'activitat microbiològica. Un baix contingut d'humitat del biofiltre inhibeix l'activitat biològica, però un excés en la humidificació pot conduir a una reducció de la superfície disponible, generant zones anaeròbiques i fins i tot a la inundació del biofiltre.

Altres paràmetres importants que s'han de tenir en compte en el disseny d'un biofiltre poden ser el pH, la pèrdua de càrrega i l'àrea superficial del material de rebliment, especialment en sistemes de tractament de compostos reduïts de sofre, on l'oxidació dels contaminants pot conduir a l'acidificació o acumulació de S⁰. Eventualment, un pH baix pot causar inhibició del creixement microbià (Yang i Allen, 1994) i l'acumulació de sofre pot ocasionar la pèrdua de càrrega i la reducció de l'àrea superficial operativa del biofiltre (Fortuny *et al.*, 2008). La biofiltració d'H₂S ha estat àmpliament descrita a la literatura (Hirai *et al.*, 1990; Cho *et al.*, 1991; Yang i Allen, 1994; Chung *et al.*, 1996; Duan *et al.*, 2006), tot i així la generació de productes àcids o sòlids durant l'oxidació del H₂S han fet d'aquest tipus de tractament biològic una opció limitada per a la dessulfuració de gasos.

ii. Biofiltres percoladors

Els biofiltres percoladors es consideren una modificació dels biofiltres convencionals. Les principals diferències són que aquests estan empaquetats amb un material de rebliment inert i que contenen una fase líquida que contínuament està recirculant a través del cos del biofiltre percolador (fig. 1.4). Els microorganismes creixen adherits al material de rebliment inorgànic i en contacte directe amb el corrent de gas contaminat. El gas pot ser aportat a contracorrent o en el mateix sentit de recirculació de la fase líquida. La col·lecta de la fase líquida circulant es dur a terme a la part baixa del biofiltre percolador, des de on és bombejada a la zona superior del cos del biofiltre, amb una petita fracció purgada i regenerada amb medi fresc. L'existència d'una fase líquida en constant recirculació aporta els nutrients extrems necessaris per al creixement dels microorganismes i permet un màxim control del procés biològic a través de l'aportació de nutrients, l'eliminació de productes de la degradació i el control del pH (Herrygers *et al.*, 2004).

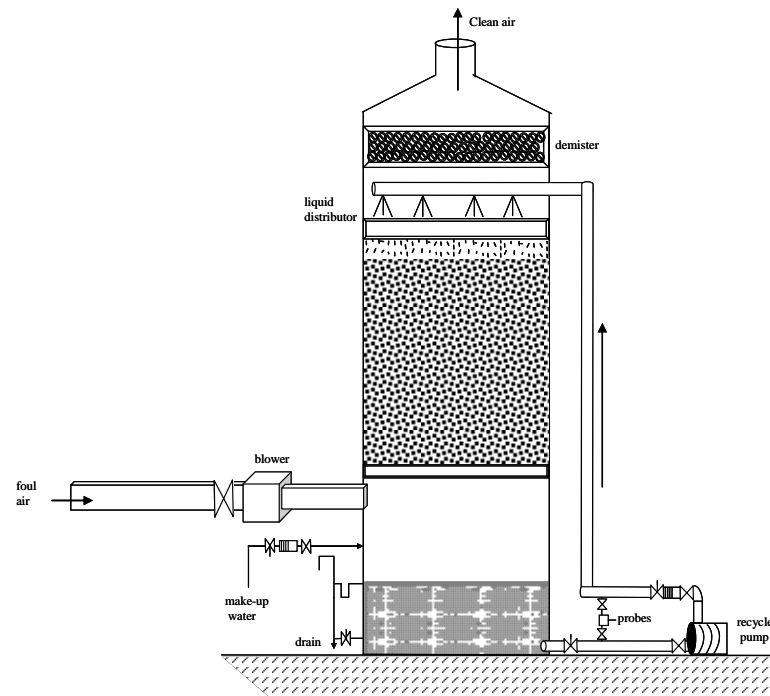


Figura 1.4. Esquema d'un biofiltre percolador

El fet que el material de rebolliment utilitzat sigui un material inorgànic i inert implica que no existeixin poblacions microbianes inherents al propi material, de manera que per a aquests tipus de bioreactors sempre és necessària una etapa d'inoculació per al seu funcionament. Per a la inoculació es poden utilitzar fangs activats o soques microbianes específiques per al tipus de contaminant a tractar (Pol *et al.*, 1994; Cox i Deshusses, 2002; Philip i Deshusses, 2003; Schieder *et al.*, 2003).

La particular configuració dels biofiltres percoladors els fa un sistema de tractament poc apropiat per a contaminants poc solubles en aigua, però són un molt bon sistema per als altament solubles en fase aquosa. Segons els estudis de Van Groenestijn i Hesselink (1993) per a que un compost pugui ser tractat amb èxit en un biofiltre percolador, el seu coeficient adimensional de repartició aire-aigua ha de ser inferior a 1. L'estudi concret d'aquesta tesi està centrat al voltant d'un biofiltre percolador tractant H_2S , un contaminant amb un coeficient adimensional de repartició aire-aigua significativament inferior a 1 (Smet *et al.*, 1998). A més a més, l'acidificació i l'acumulació de sòlids derivada de l'oxidació de compostos reduïts de sofre són fàcilment corregits gràcies a la continua recirculació de la fase líquida. La utilització de biofiltres percoladors per al tractament de compostos reduïts de sofre ha estat àmpliament descrita a la literatura (Revah *et al.*, 1994; Kasakura i Tatsukawa, 1995; Melse i Kraakman, 1998; Gabriel i Deshusses, 2003; Duan *et al.*, 2005), recentment s'ha demostrat que altes càrregues de contaminant també poden ser eficaçment eliminades mitjançant aquesta estratègia (Fortuny *et al.*, 2008).

iii. Biorentadors

Els biorentadors consisteixen en una torre d'absorció en la que el contaminant d'interès és transferit de la fase gas a la fase líquida. Opcionalment, el cos del biorentador pot estar empaquetat amb un material estructurant. Seguidament al canvi de fase del contaminant, la fase líquida és tractada en un bioreactor independent on el contaminant és biodegradat i la fase líquida és retornada a la torre d'absorció (fig. 1.5).

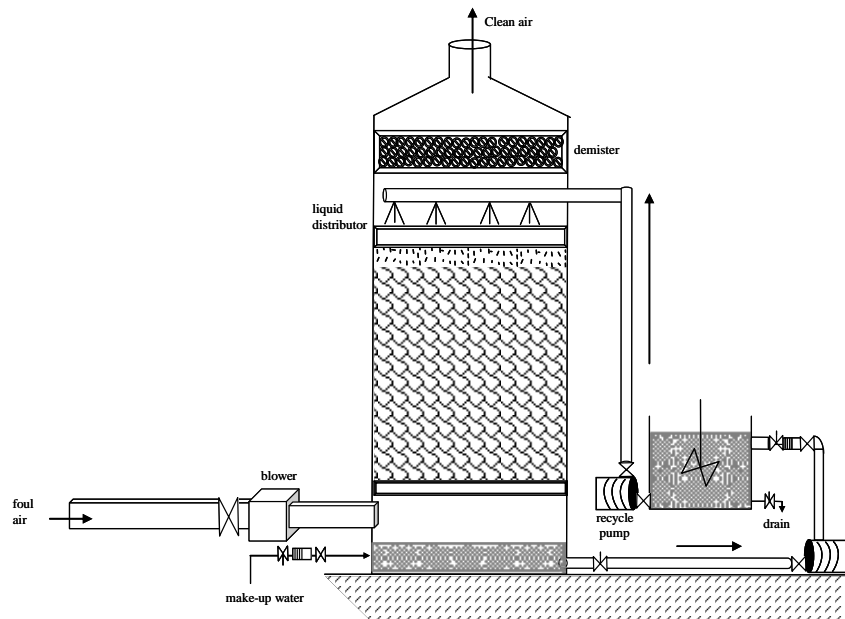


Figura 1.5. Esquema d'un biorentador

La configuració d'aquest tipus de tractament, basada en una unitat d'absorció inicial, fa que únicament els contaminants altament solubles en aigua puguin ser tractats amb biorentadors (Herrygers *et al.*, 2004). Per altre banda, permet un alt grau de control de la composició de la fase líquida, permetent actuar en l'aportació de nutrients, la eliminació de productes, la purga i la renovació. L'oxidació biològica d'altres càrregues de compostos reduïts de sofre pot generar fàcilment sòlids que en altres tipus de tractaments poden ser un problema operacional, però que en els biorentadors no generen cap problema ja que la degradació es dur a terme en un bioreactor extern. Un exemple de biorentador, disponible comercialment, per a la dessulfuració de gasos és l'anomenat procés Shell-Paques (Paques B.V. i Shell Global Solutions International B.V., Holanda).

iv. Definicions per a la biofiltració

Els bioreactors utilitzats en biofiltració tècnicament són definits i dissenyats basant-se bàsicament en quatre paràmetres: el temps de residència en llit buit (EBRT), la càrrega de tòxic (C), l'eficàcia d'eliminació (RE) i la capacitat d'eliminació (CE).

- EBRT (*empty bed residence time*)

El temps de residència en llit buit es defineix com el temps mig que triga un determinat volum de gas en travessar l'interior del reactor assumint que no existeix rebliment (equació 3).

$$EBRT = \frac{V_r}{Q_g} \quad (3)$$

On V_r és el volum total del cos del filtre (m^3), i Q_g és el cabal de gas volumètric (m^3h^{-1}).

La fase líquida o el material de rebliment ocupen una fracció significativa del volum en el reactor, de manera que el EBRT calculat és considerablement major al temps de contacte del gas a la realitat (Devanny *et al.*, 1999).

- Càrrega de tòxic (C)

Es defineix com a la massa de producte contaminant amb el que s'alimenta al reactor per unitat de volum de rebliment del mateix i per unitat de temps (equació 4).

$$C = \frac{C_g^{in} - Q_g}{V_r} \quad (4)$$

On C_g^{in} és la concentració de contaminant entrant ($g\ m^{-3}$).

- Eficàcia d'eliminació (RE)

L'eficàcia d'eliminació és freqüentment utilitzada per descriure el rendiment dels bioreactors en termes de bioconversió del contaminant. RE és defineix com a la fracció de contaminant eliminat en el bioreactor, expressat en percentatge (equació 5).

$$RE = \left(\frac{C_g^{in} - C_g^{out}}{C_g^{in}} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

- Capacitat d'eliminació (CE)

Es defineix com la massa de contaminant degradat per unitat de volum de reactor i per unitat de temps (equació 6).

$$CE = \frac{Q_g(C_g^{in} - C_g^{out})}{V_r} \quad (6)$$

1.2 BACTERIS SULFUR-OXIDANTS

Va ser Winogradsky (1887) el primer en descriure l'habilitat de certs bacteris en utilitzar energia a partir compostos químics inorgànics. Avui en dia aquest concepte es coneix com a quimiolitotròfia i descriu el metabolisme energètic d'aquells bacteris que oxiden substàncies inorgàniques, en absència de llum, com a font d'energia pel seu manteniment i creixement cel·lular. Tot i així els bacteris quimiolitòtrofs presenten una enorme diversitat taxonòmica al voltant d'una gran varietat de substrats inorgànics com a font d'energia, així com en funció del mode de nutrició de carboni. A la figura 1.6 es presenten els diferents metabolismes en funció de les estratègies energètiques possibles per a l'oxidació de compostos inorgànics. En aquest sentit apareix el concepte d'autotròfia com l'assimilació de carboni inorgànic, principalment CO₂, com la principal o única font de carboni biosintètic pel creixement bacterià. Així doncs l'estratègia autòtrofa es diferencia dels metabolismes quimiolitòtrofs que utilitzen nutrients orgànics com a font de carboni (heteròtrofs). Tot i així, també existeixen una gran diversitat de microorganismes quimiolitòtrofs que són capaços de créixer mitjançant ambdues estratègies d'assimilació de carboni, aquest metabolisme que és conegut com a mixotròfia, resulta una estratègia molt interessant per l'avantatge metabòlic que pot suposar en ambients complexes.

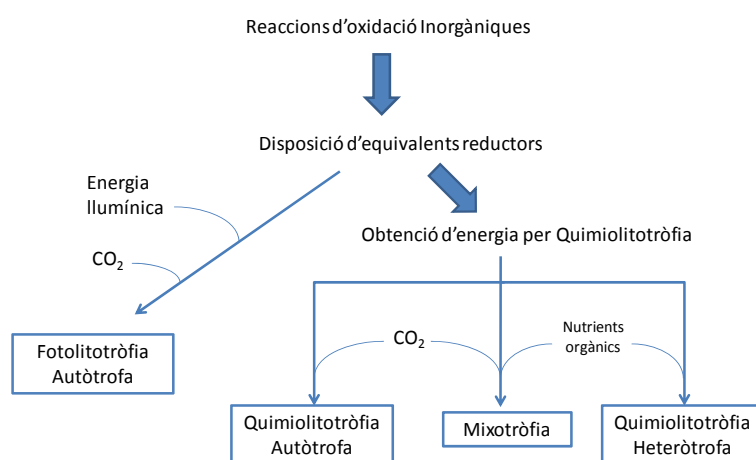


Fig. 1.6. Esquema il·lustratiu de les reaccions d'oxidació inorgàniques, relacionades amb el metabolisme quimiolitotrófic i fotolitotrófic.

L'oxidació biològica de compostos reduïts de sofre és una reacció freqüent i abundant en ecosistemes terrestres i aquàtics naturals (Luther III *et al.*, 1991). Entre la gran diversitat de microorganismes sulfur-oxidants identificats, existeixen diferents grups d'eubacteris i alguns grups d'arqueobacteris que són capaços de dur a terme l'oxidació dissimilatòria de compostos reduïts de sofre.

Taula 1.4. Bacteris capaços de créixer litotròficament en presència de compostos reduïts de sofre. (Adaptada de Friedrich,1998; Brüser *et al.*, 2004; Robertson i Kuenen, 2006; Teske i Nelson, 2006; Imhoff,2006; Huber i Prangishvili, 2006; Cohen i Gurevitz, 2006).

	Foto-tròfia ¹	Quimio-tròfia ¹	Auto-tròfia ²	pH òptim	Oxidació de ¹				Producte
					HS ⁻	S ₂ O ₃ ²⁻	S ₄ O ₆ ⁴⁻	S ⁰	
BACTERIA									
Hydrogenobacter & families	-	+	Obl. / Kr		-	+		+	SO ₄ ²⁻
Chlorobiaceae	+	-	Obl. / Kr		+	+	-	+	SO ₄ ²⁻
Chloroflexaceae	+	+	Fac. / H		+	-	-	-	S ⁰
α-proteobacteri									
<i>Rhodobacter</i>	-	+	Fac. / Clv	5-7	+	+	-	+	SO ₄ ²⁻
<i>Paracoccus versutus</i>	-	+	Fac. / Clv	6-8	+	+	-	+	SO ₄ ²⁻
<i>Acidiphilium acidophilum</i>	-	+	Fac.	3-4	+	-	+	+	SO ₄ ²⁻
<i>Thiobacillus novellus</i>	-	+	Fac. / Clv	6-8		+	+	-	SO ₄ ²⁻
β-proteobacteri									
<i>Thiobacillus thioparus</i>	-	+	Obl. / Clv	6-8	+	+	+	+	S ⁰ , SO ₄ ²⁻
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	-	+	Obl. / Clv	6-8	+	+	+	+	SO ₄ ²⁻
<i>Thiobacillus aquaesulis</i>	-	+	Obl. / Clv	7.5-8		+			SO ₄ ²⁻
<i>Thiomonas thermosulfatus</i>	-	+	Fac.	5.2-5.6		+	+	+	SO ₄ ²⁻
<i>Thiomonas perometabolis</i>	-	+	Fac.	5.5-6		+	+	+	SO ₄ ²⁻
<i>Thiomonas cuprina</i>	-	+	Fac.	3-4		-	-	+	SO ₄ ²⁻
<i>Thiomonas intermedia</i>	-	+	Fac. / Clv	5.5-6	+	+	+	+	SO ₄ ²⁻
γ-proteobacteri									
Chromatiaceae	+	+	Fac. / Clv		+	+	-	+	SO ₄ ²⁻
Ectothiorhodospiraceae	+	+	Fac.	7-10	+	+	-	+	S ⁰ , SO ₄ ²⁻
<i>Beggiatoa</i>	-	+	Fac.	6-8	+	+			SO ₄ ²⁻
<i>Thioploca</i>	-	+	Fac.	6-8	+				SO ₄ ²⁻
<i>Acidothiobacillus ferrooxidans</i>	-	+	Obl.	2-4	+	+	+	+	SO ₄ ²⁻
<i>Acidothiobacillus caldus</i>	-	+	Obl.	1-3.5		+			SO ₄ ²⁻
<i>Acidothiobacillus thiooxidans</i>	-	+	Obl. / Clv	2-4	+	+	+	+	SO ₄ ²⁻
<i>Thermithiobacillus tepidarius</i>	-	+	Obl.	6-8	+	+	+	+	SO ₄ ²⁻
<i>Halothiobacillus hydrothermalis</i>	-	+	Obl.	7.5-8		+			SO ₄ ²⁻
<i>Halothiobacillus halophilus</i>	-	+	Obl.	7		+			SO ₄ ²⁻
<i>Halothiobacillus neapolitanus</i>	-	+	Obl. / Clv	6-8	+	+	+	+	SO ₄ ²⁻
<i>Thiomicrospira</i>	-	+	Obl. / Clv	6-8	+	+	+		SO ₄ ²⁻
<i>Achromatium</i>	-	+			+				SO ₄ ²⁻
ε-proteobacteri									
<i>Thiovulum</i>	-	+	Obl.	6-8	+				SO ₄ ²⁻
<i>Sulfurimonas denitrificans</i>	-	+	Obl. / Clv	6-8	+	+	+	+	SO ₄ ²⁻
Cyanobacteria									
<i>Oscillatoria</i>	+	-	Obl. / Clv	7-10	+	-	-	-	S ⁰
Bacteris Gram-positiu									
<i>Sulfobacillus</i>	-	+						+	SO ₄ ²⁻
ARQUEOBACTERI									
Crenarchaeota									
<i>Acidanus</i>	-	+	Obl. / Clv	2-3	+		+	+	SO ₄ ²⁻
<i>Sulfolobus</i>	-	+	Fac. / Clv	2-3	+		+	+	SO ₄ ²⁻

Descripció de la taula: ¹+ = Propietat present, - = Propietat absent; ²Obl. = Autòtrof obligat, Fac. = Autòtrof facultatiu, H = Cicle del Hidroxipropionat, Kr = Cicle de Krebs reductiu, Clv = Cicle de Calvin. Cel·la en blanc = informació no disponible.

Tradicionalment, el terme “bacteris del sofre” era utilitzat per a classificar taxonòmicament els bacteris litotròfics oxidants de compostos de sofre. No obstant, avui en dia es coneix que aquest grup inclou diversos grups de microorganismes com els bacteris verds del sofre (Chlorobiaceae), els bacteris porpres del sofre (Chromatiaceae i Ectothiorhodospiraceae) i els bacteris incoloros del sofre, els quals poden pertànyer al *phylum Proteobacteria* (ex: gèneres *Beggiatoa*, *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Thioploca*, *Thiosphaera*, *Thiospira*, *Thiothrix* i *Thiovulum* entre d'altres), o també al domini Arqueobacteri (ex: *Sulfolobus* i *Acidianus*). Així doncs, l'habilitat de créixer a partir de l'oxidació de compostos reduïts de sofre no es restringeix a un grup concret de microorganismes, sinó a una gran varietat d'espècies fotòtrofes i quimiòtrofes presenten aquesta capacitat metabòlica.

A la taula 1.4 es comparen diferents bacteris sulfur-oxidants que han estat caracteritzats taxonòmicament a nivell de 16S rRNA. La diversitat filogenètica existent, juntament amb la múltiple capacitat d'utilització de compostos de sofre com a font d'aliment, demostren la varietat metabòlica de la capacitat sulfur-oxidant d'aquests microorganismes. Conseqüentment, les rutes metabòliques d'oxidació d'aquests compostos sulfurosos que apareixen en diversos grups taxonòmics es presenten com a rutes variables i divergents evolutivament entre elles (Friedrich *et al.*, 2001).

1.2.1 MODELS METABÒLICS D'OXIDACIÓ DE COMPOSTOS DE SOFRE

La gran majoria d'estudis fisiològics i enzimàtics al voltant de l'oxidació biològica de compostos reduïts de sofre s'han dut a terme principalment al voltant d'espècies oxidants de tiosulfat i sulfur. Algunes de les espècies quimiòtrofes més estudiades pertanyen al gènere de *Thiobacillus* (Beller *et al.*, 2006). Per altre costat, els estudis al voltant d'espècies fotòtrofes s'han centrat al voltant de l'espècie *Allochromatium vinosum* (Dahl *et al.*, 2005). Fins al moment es coneixen tres vies metabòliques clarament diferenciades en el mecanisme d'oxidació de tiosulfat. De manera que per a l'oxidació d'altres compostos com el sulfur, el sofre elemental i els politionats s'ha relacionat la ruta metabòlica específica a algun dels models metabòlics proposats per a l'oxidació de tiosulfat.

i. Via d'oxidació de tiosulfat ramificada

Actualment, aquesta via metabòlica és considerada constituent dels grups de bacteris fotòtrofs, de la subclasse proteobacteris gamma i dels bacteris quimiòtrofs obligats, de la subclasse proteobacteris beta. Algunes de les espècies relacionades amb aquesta via d'oxidació de tiosulfat són *Allochromatium vinosum*, *Thiocapsa*

roseopersicina i *Thiobacillus denitrificans*, de la mateixa manera es considera molt probable que altres espècies com *Thiobacillus thioparus*, algunes espècies de *Beggiatoa* i alguns membres de Chlorobiaceae també desenvolupin aquesta via d'oxidació de tiosulfat (Brüser et al., 2004).

La ramificació de la via es produeix en funció de l'existència del grup sulfonil al compost d'entrada a la via d'oxidació (fig 1.7). El sulfur, ja sigui d'origen exogen o bé produït pels enzims tiosulfat reductasa o rhodanasa, és oxidat i acumulat a l'espai periplasmàtic en forma de S° , on és emmagatzemat en funció de la disponibilitat en el medi i en el mateix periplasma. Aquesta reacció és catalitzada per l'enzim sulfur:quinona oxidoreductasa (SQR). SQR és una proteïna integral de membrana que transfereix els electrons del sulfur a la ubiquinona de membrana. El sistema de transport de sulfurs (SCS) permet el transport dels polisulfans i polisulfurs a través de la membrana cel·lular mitjançant l'activitat sulfidril transferasa del costat periplasmàtic de la membrana i l'activitat heterodisulfur reductasa del costat citoplasmàtic de la membrana. El sulfur citoplasmàtic s'usa com a substrat per a la reacció reversa de la sulfit reductasa produint sulfit, de manera que s'acaba oxidant fins a sulfat via l'oxidació depenent d'AMP en dos passos. El sulfat produït al citoplasma és exportat i alliberat al medi exterior juntament amb el sulfat produït en l'espai periplasmàtic. Tot el flux d'electrons derivats de l'oxidació dels diferents compostos reduïts de sofre és dirigit a la fosforilació oxidativa via la cadena de transport d'electrons.

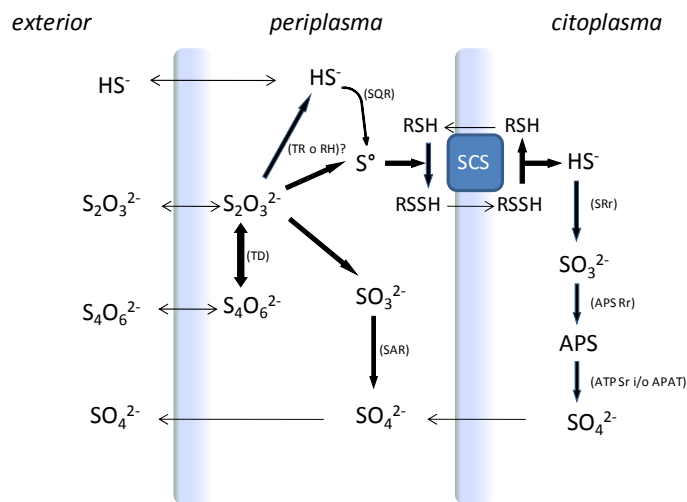


Figura 1.7 Model de la via d'oxidació de tiosulfat ramificada. En fletxes negres amples: reaccions químiques. En fletxes negres fines: processos de transport. SCS: sistema de transport de sulfur. APS: adenosina-5'-fosfosulfat (producte de l'oxidació indirecta de sulfit). Entre parèntesi es mostren els enzims proposats. SQR: sulfur:quinona oxidoreductasa. SAR: sulfit:acceptor oxidoreductasa. TD: tiosulfat deshidrogenasa. TR: tiosulfat reductasa. RH: rhodanasa. SRr: sulfit reductasa reversa. APS Rr: APS reductasa reversa. ATP Sr: ATP sulfurilasa reversa. APAT: adenilil-sulfat:fosfat adenilil-transferasa (adaptat de Brüser et al., 2004)

ii. Via d'oxidació del tetratióat

L'oxidació de tiosulfat per la via d'oxidació del tetratióat és probablement la via més incerta de les tres possibles vies d'oxidació de tiosulfat. La controvèrsia resideix en com el tiosulfat pot ser oxidat a sulfat a través de la generació de politionats com a intermediaris. El treball de Vishniac (1952) va ser el primer en proposar per a l'espècie *Thiobacillus thioparus*, l'oxidació de tiosulfat mitjançant la formació de tetratióat. Posteriorment, estudis més recents com els de Kelly *et al.* (1997), Suzuki (1999) i Massau *et al.* (2001) han confirmat la ruta metabòlica, tot i que a dia d'avui, encara existeixen molts dubtes sobre el mecanisme enzimàtic de la via d'oxidació del tetratióat. Una de les evidències comprovades d'aquesta via metabòlica és que el tiosulfat és convertit quantitativament a tetratióat. El catalitzador d'aquest primer pas és l'enzim tiosulfat deshidrogenasa, que ha pogut ser purificat en algunes espècies de *Thiobacillus* (Visser *et al.*, 1996). Posteriorment a la formació estequiomètrica de tetratióat, aquest és oxidat a sofre, sulfit i sulfat gràcies a l'actuació de diferents complexos enzimàtics encara no ben definits. Tot i l'existència de diferents models específics proposats (fig. 1.8), el coneixement al voltant de la via d'oxidació del tetratióat és considerablement ambigua i cada estudi específic al voltant d'aquest metabolisme sembla no poder ser generalitzable a un únic mecanisme enzimàtic.

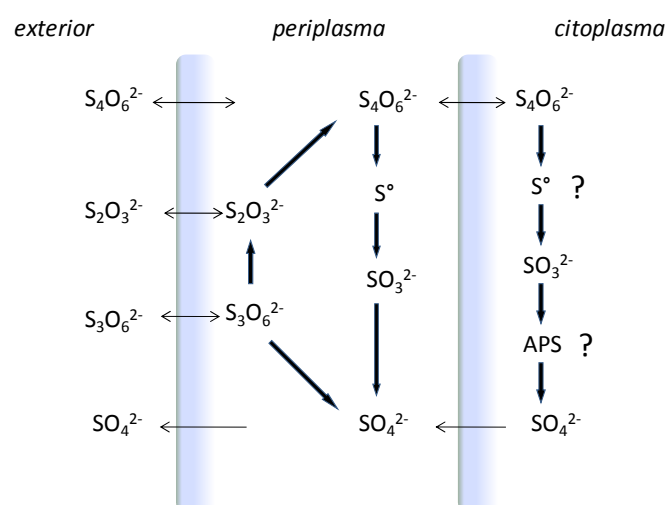


Figura 1.8. Model d'oxidació del tetratióat per a l'oxidació de tiosulfat en espècies aeròbiques obligades de *Thiobacillus*. APS= adenosina-5'-fosfosulfat (producte de l'oxidació indirecta de sulfit). Figura adaptada de Brüser *et al.* (2004). Notar l'ambigüitat del model proposat.

Bacteris autòtrofs obligats de la subclasse proteobacteris gamma com *Thermithiobacillus tepidarius*, *Halothiobacillus neapolitanus*, *Acidothiobacillus ferroxidans*, *Acidothiobacillus caldus* i *Acidothiobacillus thiooxidans*, així com bacteris autòtrofs facultatius de la subclasse proteobacteris alfa com *Acidiphilium acidophilum*, possiblement oxiden el tiosulfat mitjançant la via d'oxidació del tetratióat (Kelly *et al.*, 1997).

iii. Via d'oxidació del complex multi-enzimàtic Sox

Inicialment l'idea d'una via d'oxidació de tiosulfat mitjançant l'actuació d'un complex multi-enzimàtic va ser formulada per Lu i Kelly el 1988 basant-se en els estudis fets en *Paracoccus versutus* (també anomenat *Thiobacillus tepidarius*). Originalment, la ruta metabòlica es va anomenar via PSO o “*Paracoccus Sulfur Oxidation pathway*” i el sistema enzimàtic es va definir com a TOMES “thiosulfate-oxidizing multi-enzyme system” (Kelly *et al.*, 1997). Posteriorment, l'estudi del complex multi-enzimàtic proposat es va centrar al voltant de l'espècie *Paracoccus pantotrophus*, com el bacteri quimiolitotrof model per a l'estudi del mecanisme d'oxidació de compostos reduïts de sofre. La completa caracterització del sistema enzimàtic sulfur-oxidant en el proteobacteri alfa *P. pantotrophus* (Rother *et al.*, 2001), així com la identificació i cerca dels respectius gens en diversos genomes d'altres bacteris quimiòtrofs i fotòtrofs ha permès postular el mecanisme enzimàtic d'oxidació de compostos de sofre anomenat “sistema Sox” (Friedrich *et al.*, 2001; Friedrich *et al.*, 2005).

El clúster de gens *sox*, inicialment descrit en *P. pantotrophus*, està constituït per 15 gens (fig 1.10) organitzats almenys en dues unitats transcripcionals. Set dels gens del clúster, *soxXYZABCD*, codifiquen proteïnes essencials per a la sulfur-oxidació *in vitro*. L'expressió d'aquests gens, juntament amb els *soxFGH* és induïble per tiosulfat (Friedrich *et al.*, 2000; Rother *et al.*, 2001). Els polipèptids resultants dels gens *soxXYZABCD* constitueixen quatre proteïnes periplasmàtiques designades SoxXA, SoxYZ, SoxB i SoxCD. Aquestes proteïnes constitueixen el sistema enzimàtic Sox, i catalitzen l'oxidació de sulfur, sofre inorgànic, tiosulfat i sulfat amb la reducció del citocrom *c* com a acceptor final d'electrons (equació 7).



El complex SoxYZ és la proteïna central del sistema Sox i interacciona amb les proteïnes SoxXA, SoxCD i SoxB. A la figura 1.9 es mostra el model proposat per Friedrich *et al.* 2008 per al sistema enzimàtic Sox de *P.pantotrophus*. Una descripció detallada del model així com la seva regulació es poden trobar en les referències anteriorment esmentades.

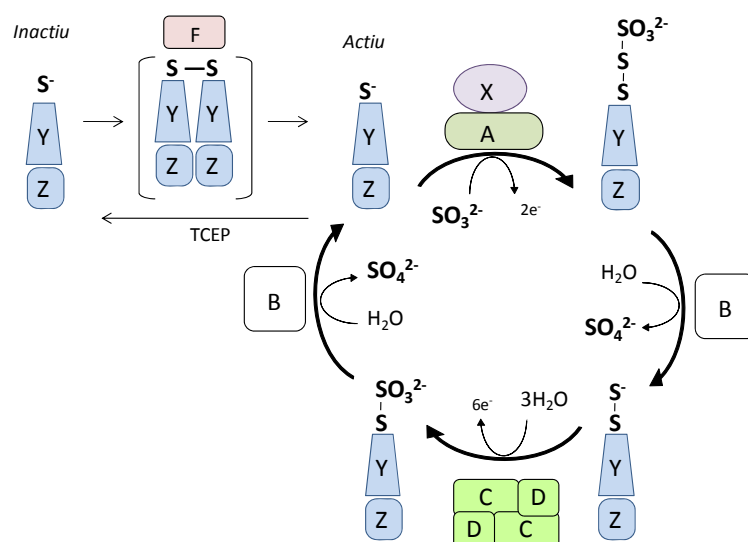


Figura 1.9 Model de reacció cíclica pel sistema enzimàtic Sox en l'oxidació de tiosulfat de l'espècie *P. pantotrophus*. En majúscules es mostren les respectives proteïnes Sox. Activació de la proteïna SoxYZ per la flavoproteïna SoxF. TCEP= tris(2-carboxietil)fosfina. Figura adaptada de Friedrich *et al.* (2008).

Fins al moment s'ha identificat la presència completa del sistema enzimàtic Sox a tots els membres de la subclasse proteobacteris alfa, mentre que en els membres de les subclasse proteobacteris beta, proteobacteris gamma i Chlorobiaceae contenen el clúster de gens *sox*, tot i que amb la manca dels gens que codifiquen l'enzim sulfur deshidrogenasa (*soxCD*). Fet que indica una via metabòlica diferent en l'oxidació de sofre a sulfat entre els diferents grups anteriorment esmentats (Friedrich *et al.*, 2005). Alguns grups de bacteris generadors de glòbuls de sofre intracel·lulars, com són els bacteris verds del sofre i algunes espècies de bacteris porpres del sofre (*A. vinosum*), contenen en el seu genoma l'operó DSR (sulfít reductasa dissimilatòria) per tal de suplir la manca dels gens *soxCD* (Dahl *et al.*, 2005) i, d'aquesta manera, poder oxidar el sofre acumulat intracel·lularment.

Per altre banda, s'ha identificat algun grup de microorganismes acidòfils i termòfils amb capacitat sulfur-oxidant que utilitzen un sistema enzimàtic diferent al sistema Sox (Müller *et al.*, 2004). Aquest grup d'arqueobacteris, concretament estudiats en el model *Acidianus ambivalens* (Kletzin, 2008) poden oxidar compostos reduïts de sofre per diferents vies metabòliques catalitzades per varis enzims, principalment el SOR (reductasa oxigenasa de sulfur soluble) (Urich *et al.*, 2004), i el TQO (tiosulfat:quinona oxidoreductasa) (Kletzin, 2008).

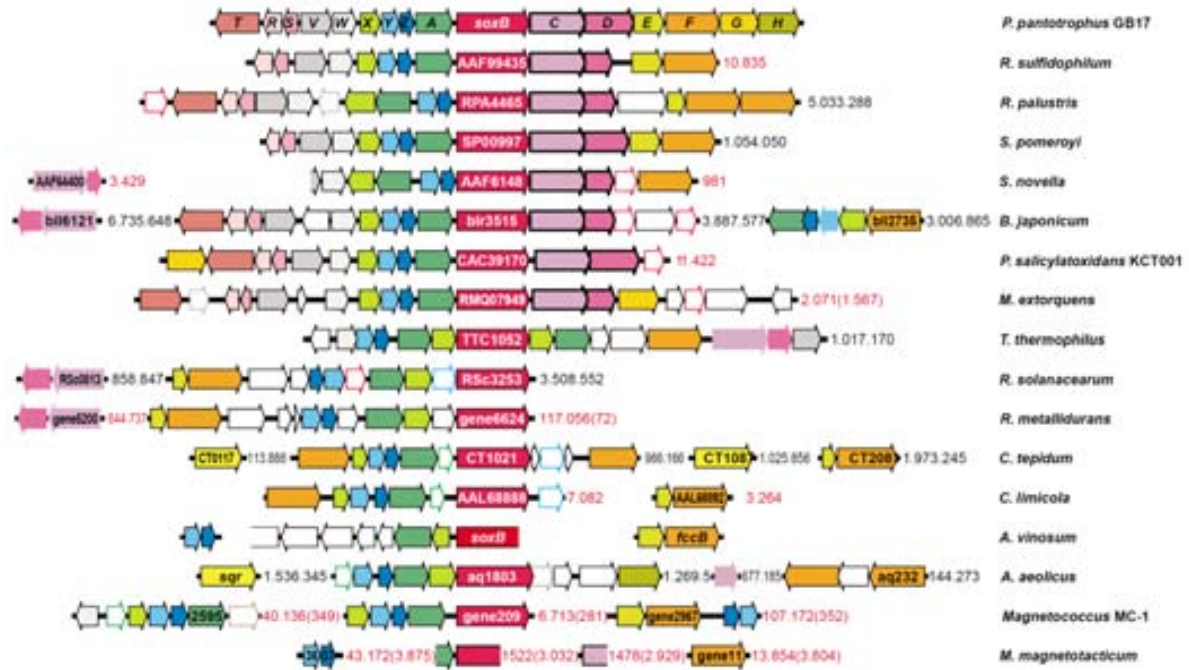


Figura 1.10 Esquema del *locus sox* de *P.pantotrophus* i d'altres *loci* homòlegs d'altres espècies sulfur-oxidants quimiòtrofs i fotòtrofs. Gens codificants per a proteïnes homòlogues es presenten en colors idèntics. La localització dels gens en els cromosomes es presenten mitjançant la numeració dels nucleòtids. Els genomes seqüenciats completament mostren la numeració en negre i els parcialment seqüenciats en vermell. Figura obtinguda de Friedrich *et al.* (2005).

iv. Vies oxidatives particulars dels bacteris verds del sofre

Els bacteris verds del sofre (ordre Chlorobiales), són bacteris anaerobis estrictes fotosintètics que oxiden majoritàriament compostos reduïts de sofre pel seu creixement fotoautòtrof (Overmann, 2006). Els mecanismes metabòlics d'aquests grups de bacteris en l'oxidació de compostos reduïts de sofre presenta certes variacions respecte les vies d'oxidació anteriorment descrites (Gregersen *et al.*, 2011). Totes les espècies presenten l'enzim SQR i els productes d'oxidació de sulfur són oxidats fins a sulfat via el sistema DSR. Aquesta conformació del sistema metabòlic sembla ser adquirit per transferència horitzontal de bacteris sulfur-oxidants i bacteris sulfat-reductors. De la mateixa manera, els bacteris verds del sofre també presenten parcialment el sistema Sox, tot i que sense la presència dels gens *sox CD*, que supleixen amb el sistema DSR (Gregersen *et al.*, 2011).

Tot i la breu menció de les vies sulfur-oxidants existents en els bacteris verds del sofre, aquest grup de bacteris no es consideren rellevants en la temàtica d'aquesta tesi. Una detallada descripció tant bioquímica com genòmica d'aquests microorganismes es pot trobar en les referències anteriorment esmentades.

1.3. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR PER A L'ESTUDI DE COMUNITATS MICROBIANES

El desenvolupament de noves eines de biologia molecular per a l'estudi de les comunitats microbianes ha permès grans avenços en l'estudi de l'ecologia microbiana d'una gran diversitat d'ambients complexos. En aquest sentit, en el camp de l'enginyeria de bioprocessos s'han aplicat, de manera eficaç diverses tècniques de biologia molecular per a l'estudi de les poblacions microbianes desenvolupades en aquests sistemes (Talbot *et al.*, 2008). La majoria d'aquestes noves tècniques es basen en l'anàlisi de marcadors moleculars específics d'espècie. Les seqüències gèniques ribosomals són un dels marcadors moleculars més recurrents en aquestes aproximacions ja que actuen com a empremta filogenètica en l'anàlisi de comunitats complexes. No obstant, existeixen procediments d'estudi filogenètic basats en d'altres marcadors moleculars com els lípids de membrana. Així doncs, a partir d'aquests marcadors filogenètics s'han desenvolupat un seguit d'estratègies d'anàlisi com són el clonatge i seqüenciació de gens ribosomals, la hibridació *in situ* per fluorescència (FISH), l'electroforesi en gel amb gradient desnaturalitzant (DGGE), el polimorfisme de conformació de cadena única (SSCP), l'anàlisi de restricció del DNA ribosomal amplificat (ARDRA), el polimorfisme de longitud dels fragments de restricció terminals (T-RFLP) i l'anàlisi dels espaiadors intergènics ribosomals (RISA) en són alguns exemples, que han estat aplicats amb èxit en l'estudi de poblacions en comunitats complexes.

1.3.1 FONAMENTS I APLICACIONS DE MARCADORS FILOGENÈTICS MOLECULARS

Durant les últimes dècades, les tècniques basades en els marcadors filogenètics moleculars han esdevingut una aproximació efectiva i global en l'estudi i anàlisi de les comunitats microbianes en una gran diversitat d'ecosistemes (Marsh, 1999; Dorigo *et al.*, 2005). En aquest sentit, un dels principals marcadors filogenètics estudiats han estat els gens que codifiquen el 16S rRNA i en menor mesura el 23S rRNA juntament amb les regions intergèniques existents en aquestes unitats transcripcionals. El ribosoma procariòtic està conformat per dues subunitats, una petita (SSU) i una gran (LSU), cada una d'aquestes està formada per l'associació entre proteïnes ribosomals i rRNA, en concret la SSU presenta el rRNA 16S d'aproximadament 1.600 nucleòtids, mentre que la LSU està constituïda pels rRNAs 23S i 5S d'aproximadament 3.000 i 120 nucleòtids, respectivament. La seqüència dels rRNAs presenta zones altament conservades contraposades amb regions de seqüència molt variable (fig. 1.11). Aquesta característica fa dels rRNAs uns potents marcadors moleculars permetent

l'elaboració d'arbres filogenètics molt robusts, de manera que en funció de la similitud o diferència de seqüència de rRNA classifiquen els microorganismes en dominis i taxons en base a la seva proximitat filogenètica a nivell molecular (Woese *et al.*, 1990). A més, cada cèl·lula conté múltiples ribosomes (100-100.000 per cèl·lula procariota) i múltiples còpies dels gens de rRNA a cada cromosoma, facilitant en gran mesura la seva detecció en les mostres a estudiar. Per tot plegat, l'ús des de fa uns 30 anys d'aquests gens com a marcadors filogenètics (Woese i Fox, 1977), va suposar una revolució en el camp de l'ecologia microbiana i a esdevingut una eina essencial per l'estudi de la diversitat microbiana.

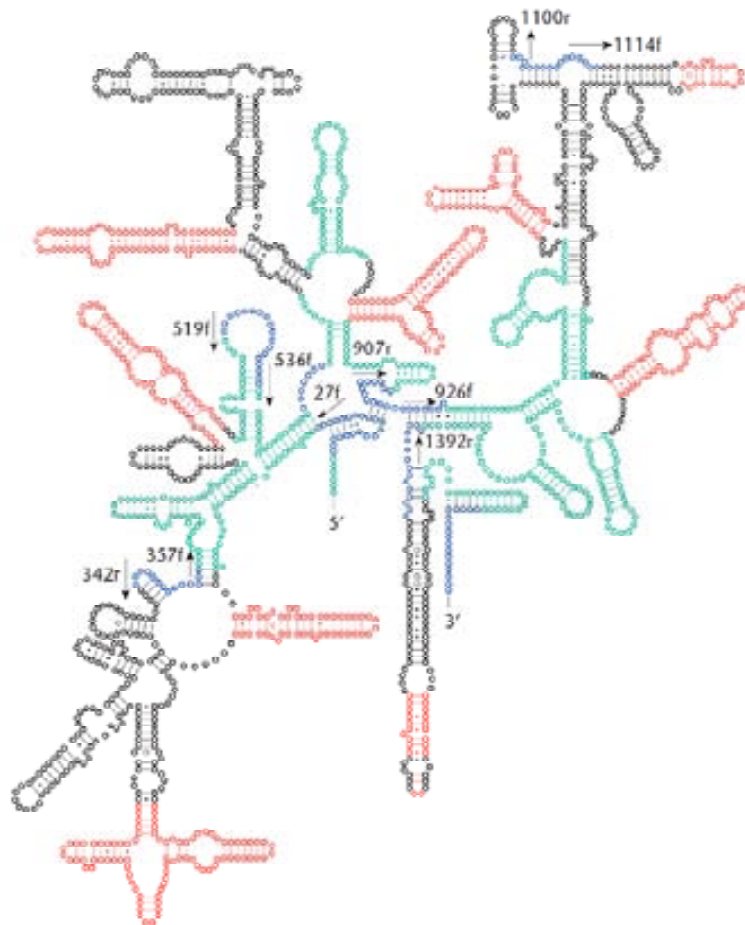


Figura. 1.11 Estructura secundària d'una molècula 16S rRNA model en base *Escherichia coli*. Les regions altament variables es mostren en vermell, les altament conservades es mostren en verd, en negre els altres nucleòtids. Els llocs d'unió dels encebadors més freqüents utilitzats en l'amplificació per PCR es mostren en blau, les fletxes mostren la direccionalitat d'amplificació d'alguns encebadors freqüentment usats (Stackebrandt, 2001).

Paral·lelament als treballs basats en la filogenia dels gens ribosomals, s'han desenvolupat diversos repositoris de dades públiques, com són la base de dades del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) el Ribosomal Database Project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>; Cole *et al.*, 2009) o la base de dades de SILVA (<http://www.arb-silva.de/>; Pruesse *et al.*, 2007), que faciliten l'anàlisi i interpretació de

les dades en base a la comparació de seqüències d'aquests gens. En aquest sentit han aparegut multitud d'eines informàtiques per a la gestió i comprensió de la gran quantitat d'informació de seqüència disponible, permeten la construcció d'arbres filogenètics així com el disseny d'encebadors i sondes per a grups bacterians específics (ARB Project; Ludwig *et al.*, 2004).

Per altre costat existeixen altres tècniques bioquímiques basades en l'anàlisi dels lípids cel·lulars com a marcadors filogenètics moleculars per a l'estudi i caracterització de comunitats microbianes. L'anàlisi dels àcids grassos dels fosfolípids de membrana (PLFA) és una tècnica que permet estudiar la composició de la biomassa, la fisiologia i viabilitat cel·lular, la taxonomia de la mostra i inclús la funcionalitat dels grups presents (Green i Scow, 2000). Els lípids en general, constitueixen al voltant d'un 5% del pes sec d'un bacteri (Lechevalier, 1977) de manera que presenten notables diferències estructurals i funcionals entre ells. Aquestes característiques mitjançant la tècnica PLFA es tradueixen en un eficaç marcador filogenètic que permet la caracterització de les comunitats microbianes en base a l'anàlisi i comparació dels lípids en bases de dades específiques. La metodologia d'anàlisi està descrita detalladament per Findlay (1996). Una de les aproximacions més integrals a l'hora de caracteritzar una comunitat complexa mitjançant l'anàlisi PLFA és l'ús de la informació de tots els lípids (fins a 50-100 en mostres ambientals) col·lectivament com una empremta taxonòmica per a aquella comunitat específica (Bossio i Scow, 1998). Freqüentment en l'estudi de les comunitats microbianes per PLFA s'utilitzen mètodes estadístics multivariats per a simplificar les dades i revelar els patrons per a cada mostra (Ludvigsen *et al.*, 1997).

1.3.2 CLONATGE I SEQÜENCIACIÓ DELS GENS 16S rRNA

La metodologia de clonatge i seqüenciació del gen de 16S rRNA ha estat una de les aproximacions més habituals en l'estudi de la composició bacteriana de diversos ambients i bioprocessos (Giovannoni *et al.*, 1990; Talbot *et al.*, 2008). L'existència de regions universalment conservades en els extrems 3' i 5' de les seqüències gèniques de 16S rRNA permet l'amplificació per PCR, mitjançant l'ús d'encebadors universals, de pràcticament la totalitat de gens 16S rRNA presents en la mostra. L'estudi filogenètic es fonamenta en base a les regions internes hipervariables existents en el gen amplificat. El procés de clonatge posterior a l'amplificació dels fragments, permet mantenir i processar separatament cada una de les seqüències i així caracteritzar-les individualment per seqüenciació.

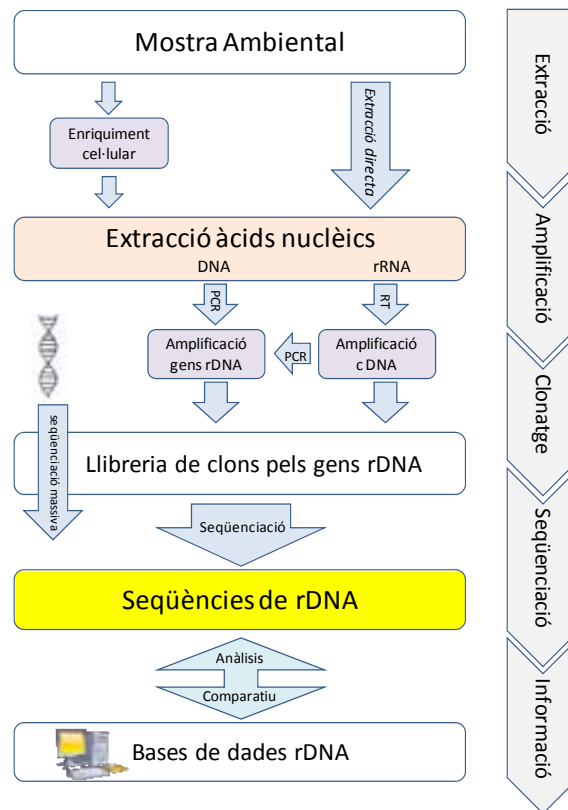


Figura. 1.12 Diagrama resum de les diferents possibilitats en la caracterització d'una mostra ambiental mitjançant la construcció d'una llibreria de clons en base a les seqüències dels gens de rRNA. RT, transcriptasa reversa.

En funció de les característiques de la mostra i de l'objectiu d'estudi (fig. 1.12) el procediment metodològic a seguir presenta certes particularitats, però en general la metodologia passa per una extracció inicial global dels àcids nucleics de la mostra, generalment DNA genòmic, seguida per una amplificació dels fragments dels gens 16S rRNA. En base a l'elecció dels encebadors d'amplificació és possible focalitzar a nivell taxonòmic l'abast de la llibreria de clons a construir. És recomanable no realitzar cicles d'amplificació excessivament llargs (entre 10 i 25 com a màxim) per tal de minimitzar les desviacions causades per l'amplificació preferent d'espècies dominants. No obstant aquesta problemàtica és intrínseca a totes les aproximacions basades en amplificació per PCR. Els fragments amplificats són lligats en un vector plasmídic i transformats a una cèl·lula receptora. En funció de la longitud del fragment a clonar i el mètode resolutiu d'anàlisi final, existeixen diferents metodologies per a la construcció de la llibreria de clons. Finalment els clons poden ser processats individualment i seqüenciats directament a partir dels encebadors d'amplificació inicial. En base a la informació de seqüència obtinguda per a cada un dels clons seqüenciats es realitza una caracterització filogenètica de cada clon a partir de l'anàlisi comparatiu de seqüència, mitjançant eines informàtiques, en les diferents bases de dades específiques per a seqüències ribosomals.

Un paràmetre que és necessari controlar és el nombre mínim de clons que s'ha d'analitzar per a cobrir tota la diversitat microbiana existent en la mostra a estudiar. Per determinar-lo s'usen les anomenades corbes de rarefacció que permeten analitzar la cobertura de la diversitat poblacional per a una col·lecció de clons construïda (Moyer *et al.*, 1994). A partir de l'agrupació dels clons en unitats taxonòmiques operacionals (OTU), les corbes de rarefacció relacionen el nombre de clons seqüenciats amb el nombre d'OTUs diferents totals.

El clonatge i seqüenciació dels gens 16S rRNA proporciona una profunda i acurada informació filogenètica dels membres de comunitats microbianes complexes, malgrat els desavantatges relacionats amb el temps de dedicació i els costos operacionals necessaris pel seu desenvolupament. En aquest sentit, no es considera una tècnica apropiada per a fer seguiments poblacionals en mostres periòdics. No obstant, mitjançant aquests estudis s'obté una important informació de seqüència que permet el plantejament d'estudis posteriors més específics i concrets, com per exemple estudis quantitius de PCR a temps real en base al disseny d'encebadors o al seguiment de subgrups taxonòmics mitjançant sondes d'oligonucleòtids específiques. En aquest sentit, la informació de seqüència generada resulta de gran importància en estudis de FISH pel seguiment de d'espècies i grups de microorganismes, permetent el disseny de sondes específiques per a les poblacions d'interès.

1.3.3 HIBRIDACIÓ *IN SITU* PER FLUORESCÈNCIA (FISH)

La metodologia de FISH és una tècnica àmpliament estesa en els estudis de les comunitats microbiològiques ambientals que permet hibridar mostres complexes sense alterar la morfologia ni l'estructura cel·lular dels microorganismes que la conformen. La hibridació *in situ* per fluorescència detecta seqüències concretes d'àcids nuclèics, usant sondes associades amb un fluoròfor que hibriden de manera específica amb la seva seqüència complementària present en el microorganisme d'estudi.

Mitjançant la utilització de sondes d'oligonucleòtids fluoromarcades i específiques per a molècules de 16S rRNA, és possible avaluar la identitat filogenètica, la morfologia, el nombre i la distribució espacial de microorganismes dins una mostra ambiental (Amann *et al.*, 1995). L'alt número de còpies de molècules de rRNA així com la variabilitat filogenètica intrínseca en algunes de les seves regions fan d'aquest marcador una sensible diana per a la FISH.

Els principals passos en la metodologia FISH usant rRNA com a diana es mostren en la figura 1.13. Inicialment es fixa la mostra per tal d'estabilitzar la morfologia cel·lular

a més de permeabilitzar la paret de la cèl·lula per a permetre la subsegüent hibridació. Posteriorment es realitza la incubació amb la sonda marcada, durant aquest període, els oligonucleòtids fluoromarcats difonen intracel·lularment i hibriden específicament amb la seva seqüència complementària. La llargada estàndard dels oligonucleòtids usats com a sonda per a FISH pot variar de 15 a 30 pb, però independentment de la llargada, en la majoria dels casos el fluorocrom està unit a l'extrem 5' de la sonda. L'excedent de sondes no hibridades i/o inespecífiques és eliminat abans de l'observació de la mostra. Finalment la identificació i quantificació de les cèl·lules hibridades en una mostra es pot realitzar mitjançant microscòpia d'epifluorescència o bé utilitzant la citometria de flux.

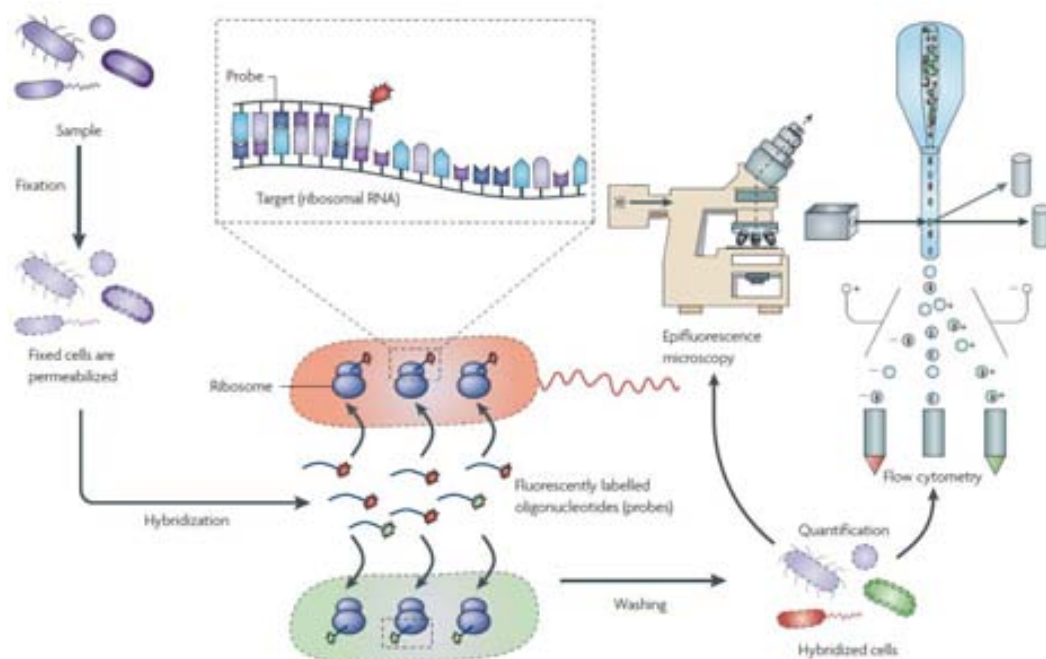


Figura 1.13 Esquema del procediment seguit en la realització de FISH. La mostra es fixa per establir les cèl·lules i permeabilitza les membranes. Les sondes poden ser fluoromarcades diferencialment, i així poder realitzar hibridacions simultànies per una mateixa mostra. Després de la hibridació, es renta l'excedent de sondes i es prepara la mostra pel tipus d'anàlisi de fluorescència escollit (Amann i Fuchs, 2008).

Mitjançant microscòpia confocal i un processament d'imatge posterior es possible quantificar, de manera relativa, la presència d'un determinat grup de bacteris en la mostra d'estudi. Jubany *et al.*, (2009) va crear un mètode automàtic per a la determinació de la fracció de biomassa hibridada específicament referida a un global de bacteris presents. Tot i que mitjançant citometria de flux la quantificació d'una senyal fluorescent seria més directe, amb l'anàlisi de FISH mitjançant microscòpia confocal existeix el valor afegit de descriure la distribució espacial de la comunitat microbiològica immobilitzada, com per exemple en estudis de biopel·lícules (Shiraishi *et al.*, 2008). Un dels avantatges més utilitzats de la tècnica FISH és la possibilitat de realitzar, en un mateix estudi, varies hibridacions simultànies usant sondes marcades

amb fluoròfors diferents. Les sondes poden reconèixer de manera diferencial seqüències específiques de diferents grups filogenètics permeten realitzar estudis de seguiment simultani de diferents grups de microorganismes en comunitats complexes (Maestre *et al.*, 2010).

L'enorme quantitat d'informació de seqüència derivada de la multitud d'estudis realitzats al voltant del gens 16S rRNA, ha propiciat l'aparició de diverses bases de dades específiques com són SILVA (SILVA rRNA database project; Pruesse *et al.*, 2007) o el Ribosomal DataBase Project (RDP release 10, Cole *et al.*, 2009), que recullen la informació de pràcticament 2.000.000 de seqüències diferents de rRNA. La disponibilitat d'aquestes dades de seqüència és d'especial importància pel disseny de noves sondes d'oligonucleòtids per a estudis de FISH. En aquest sentit, existeixen diferents programes i aplicatius lliures, estructurats al voltant d'aquestes bases de dades, per al disseny de noves sondes per a FISH, com el programa ARB (ARB: a software environment for sequence data; <http://www.arb-home.de/>; Ludwig *et al.*, 2004) i el programa PROBER (PROBER: oligonucleotide FISH probe design software; Navin *et al.*, 2006). Altres programes com el ProbeCheck (Loy *et al.*, 2008) permeten l'avaluació *in silico* de la cobertura de sondes. Per altre costat, existeixen també diversos projectes de bases de dades exclusius per a sondes específiques de seqüències de rRNA, com és el cas de la base de dades pública ProbeBase (<http://www.microbial-ecology.net/probebase/>; Loy *et al.*, 2003). Aquest ampli ventall de programes i aplicatius, es fonamenten en la informació de seqüència disponible, al mateix temps que agrupen, ordenen i racionalitzen la informació existent en les diferents bases de dades.

Degut al seu potencial, la tècnica FISH és una metodologia implementada en diversos àmbits d'estudi ja que permet visualitzar, identificar, enumerar i localitzar grups de microorganismes de manera efectiva i sensible, i independentment al seu cultiu o del seu aïllament previ. Contraposadament al seu potencial, la seva aplicació va lligada a la disponibilitat de la pròpia informació de seqüència dels microorganismes d'interès, que no sempre és troben en les bases de dades. També cal tenir present la cobertura real de les sondes escollides (Daims *et al.*, 1999) així com els falsos positius i falsos negatius que es poden generar durant el procés d'hibridació de la sonda (Siyambalapitiya i Blackall, 2005). En el camp dels bioprocessos, concretament en biofiltració, aquesta és una eina potent que ha permès realitzar el seguiment de microorganismes d'interès a diferents condicions d'operació (Maestre *et al.*, 2010).

1.3.4 ALTERNATIVES RESOLUTIVES EN L'ESTUDI DE MARCADORS FILOGENÈTICS MOLECULARS.

Alternativament al clonatge i seqüenciació dels gens 16S rRNA i a la tècnica FISH existeixen un seguit d'aproximacions resolutives paral·leles en l'estudi de marcadors filogenètics. Aquestes tècniques proporcionen informació de la diversitat microbiana existent en comunitats complexes, permeten una anàlisi ràpida i fàcil entre diferents mostres. No obstant, aquestes aproximacions estan basades en amplificació per PCR, de manera similar a la metodologia de clonatge i seqüenciació. Així doncs, aquestes tècniques també estan subjectes a possibles desviacions inherents de les etapes d'amplificació, i conseqüentment poden afectar la resolució de la diversitat. Algunes de les aproximacions més freqüents són: l'electroforesis en gel amb gradient desnaturalitzant (DGGE), el polimorfisme de conformació de cadena única (SSCP), l'anàlisi de restricció del DNA ribosomal amplificat (ARDRA), el polimorfisme de longitud dels fragments de restricció terminals (T-RFLP) i l'anàlisi dels espaiadors intergènics ribosomals (RISA).

i. Electroforesis en gel amb gradient desnaturalitzant (DGGE)

Les regions hipervariables del gen 16S rRNA poden ser amplificades per PCR a partir del DNA genòmic d'una mostra utilitzant encebadors universals que hibridin amb les regions conservades del gen. De manera que la totalitat de fragments obtinguts poden ser després diferenciats per DGGE. Aquesta tècnica es basa en l'electroforesi dels fragments dels gens rRNA en un gel d'acrilamida que conté un gradient de concentració lineal, al llarg del gel, d'un agent desnaturalitzant com és la formamida i la urea (Muyzer *et al.*, 1993). A la presència d'aquests agents desnaturalitzants s'afegeix el fet que la carrera electroforètica es realitza a altes temperatures, normalment a 60°C amb el que s'acaba d'aconseguir les condicions desnaturalitzants que permetran la diferenciació dels diferents fragments amplificats. El conjunt de fragments amplificats amb els encebadors comuns presenten una mateixa longitud, però la seqüència variable amplificada permet la separació electroforètica dels diferents fragments revelant la diversitat microbiològica de la comunitat. L'especificitat taxonòmica dels encebadors usats en el procés d'amplificació per PCR determina el o els grups de microorganismes que seran analitzats. Durant l'electroforesi, els productes de PCR corren a través del gel en forma de doble cadena fins que arriben al punt en que comencen a desnaturalitzar-se degut a la concentració creixent de desnaturalitzant existent en el gel. Una cop desnaturalitzat, interessa que cada monocadena de DNA (ssDNA) del fragment amplificat resti immòbil en el seu punt de desnaturalització, evitant doncs que el ssDNA continui corrent a través del gel. Per a assegurar aquest fet, s'afegeix a l'extrem 5' d'un dels dos encebadors usats per a

l'amplificació una cua poli-GC. Aquesta cua, que incorpora de 40-60 guanines (G) i citosines (C), proporciona als fragments amplificats una alta temperatura de desnaturalització (Roelfsema i Peters, 2005). D'aquesta manera s'aconsegueix que, durant l'electroforesi, els fragments es desnaturalitzin parcialment, restant les cues poli-GC en forma de doble cadena, generant una molècula de DNA en forma de "Y" que resta fixada firmament en la seva posició del gel d'acrilamida. (fig 1.14)

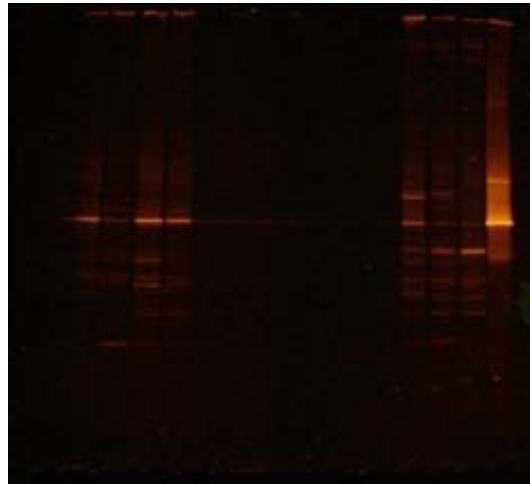


Figura 1.14 Gel de DGGE tenyit amb bromur d'etidi. Es poden observar diferents bandes en cada un dels carrils del gel. Gel carregat amb diferents mostres de zones concretes del bioreactor de dessulfuració d'alta càrrega d'H₂S.

El percentatge d'acrilamida del gel és ajustat principalment en funció de la longitud dels productes de PCR a separar. La mida de les bandes d'un gel de DGGE normalment és inferior a 500 pb, de manera que el percentatge d'acrilamida acostuma a oscil·lar entre el 6% i el 10%. El gradient desnaturalitzant del gel es defineix en funció del grau de separació que es busqui aconseguir, tenint en compte la heterogeneïtat en la composició de la mostra.

Un dels avantatges d'aquesta tècnica és que un cop separades, les bandes aparegudes poden ser recuperades i seqüenciades de manera que, idealment, és possible relacionar cada banda del gel amb una afiliació filogenètica. A més a més també permet la hibridació de sondes específiques per a poblacions concretes de la comunitat. Contraposadament, la tècnica presenta algunes limitacions com són el fet que la longitud dels fragments separats no acostumen a ser majors a 500 pb. Aquest fet limita la resolució comparativa en la identificació de seqüències diferents de gens 16S rRNA, de manera que un perfil de bandes donat pot emascarar una diversitat microbiològica major amb diferents seqüències migrant conjuntament (Vallaey *et al.*, 1997). Tot i així un dels principals desavantatges de la tècnica DGGE és que els perfils de bandes generats amb mostres especialment complexes, sovint presenten

desviacions de certes bandes dominants respecte un seguit de fragments sense resoldre que es mostren difusament en el carril (Liesack *et al.*, 1997).

La DGGE ha estat àmpliament utilitzada en microbiologia ambiental per a estudiar la diversitat i els canvis poblacionals que esdevenen en comunitats complexes (Muyzer, 1999), com poden ser els bioreactors anaeròbics (Connaughton *et al.*, 2006) o bioreactors de dessulfuració per al tractament d'emissions contaminants (Sercu *et al.*, 2006).

De manera similar a la tècnica DGGE, existeixen variacions sobre aquesta com la TGGE, que basada en el mateix fonament que l'anterior, enlloc d'un agent químic desnaturalitzant s'utilitza un gradient de temperatura al llarg del gel d'electroforesi com a factor físic desnaturalitzant. (Muyzer i Smalla, 1998).

ii. Polimorfisme de conformació de cadena única (SSCP)

La tècnica de SSCP, es basa en la mobilitat electroforètica d'una molècula de ssDNA a través d'un gel en condicions no desnaturalitzants. La migració del ssDNA depèn no només de la longitud i pes molecular sinó també de la conformació tridimensional que pot adquirir (Lee *et al.*, 1996). El plegament estructural del ssDNA és degut a la pròpia seqüència del DNA. En aquesta tècnica es realitza un procés d'amplificació per PCR, però a diferència de les metodologies de DGGE i TGGE, no s'usen encebadors amb cues poli-GC. Les anàlisis per SSCP presenten principalment dos inconvenients, un d'ells és la necessitat de fer un realineament de les molècules de ssDNA durant la migració electroforètica, especialment amb altes concentracions de DNA; i l'altre, és la possibilitat de formació de més d'una conformació estable del plegament del ssDNA, que produeix l'aparició de més d'una banda per un mateix fragment (Scwieger i Tebbe, 1998). Tot i així, la tècnica SSCP ha estat utilitzada amb èxit en diferents mostres ambientals, així com en estudis comparatius de les comunitats microbiològiques presents en digestors anaeròbics (Delbès *et al.*, 2000).

iii. Anàlisi de restricció del DNA ribosomal amplificat (ARDRA)

Una altra aproximació resolutive en l'anàlisi del marcador filogenètic 16S rRNA utilitzada en la caracterització de comunitats microbianes complexes és la tècnica ARDRA altrament coneguda com a polimorfisme de longitud dels fragments de restricció (RFLP). Aquesta, és una tècnica basada en la restricció diferencial que mostren el conjunt de seqüències de DNA obtingudes per amplificació per PCR de la mostra. Concretament, l'amplificació dels fragments de 16S rDNA són generats mitjançant encebadors universals. El conjunt de fragments obtinguts per PCR són digerits amb l'endonucleasa seleccionada, generant polimorfismes de longitud dels

fragments amplificats en funció de la pròpia seqüència i de les dianes de restricció presents. Posteriorment, els fragments són separats en base a la pròpia mobilitat electroforètica en gels d'agarosa o acrilamida (Britschgi i Giovannoni, 1991) revelant la diversitat existent en la mostra ja que el patró de restricció diferencial de cada espècie present en la mostra genera el conjunt de bandes que permetrà caracteritzar la diversitat de microorganismes existent (Massol-Deya *et al.*, 1995; Smit *et al.*, 1997). Una de les principals problemàtiques d'aquesta tècnica és l'elecció de la endonucleasa òptima per tal d'obtenir la màxima resolució en funció de la diversitat existent. Per altre banda, un problema freqüent en mostres complexes, és l'aparició de més bandes en el perfil de restricció que el numero de fragments diferents amplificats, generant una sobreestimació quan s'infereix la diversitat de la mostra a partir dels patrons obtinguts.

iv. Polimorfisme de longitud dels fragments de restricció terminals (T-RFLP)

Igual que la tècnica de ARDA, la tècnica T-RFLP es basa amb el reconeixement per part de una endonucleasa dels fragments amplificats però en aquest cas el producte d'amplificació és marcat fluorescentment gràcies a l'ús d'encebadors conjugats amb fluorocroms en els seus extrems 5'. Posteriorment a la digestió amb endonucleasa, els fragments es separen físicament i es detecta l'emissió del fluoròfor present en un dels extrems del fragment usant un seqüenciador capil·lar. Únicament els fragments derivats de la restricció que porten incorporat el marcador fluorescent terminal seran detectats en l'anàlisi. D'aquesta manera es redueix la complexitat dels perfils de restricció obtenint els resultats de l'assaig en forma d'electroforograma (Kitts, 2001).

Avaniss-Aghajani *et al.* (1994) van ser els primers en utilitzar aquesta aproximació en estudis d'identificació de microorganismes en comunitats mixtes. Més recentment altres autors han aplicat la T-RFLP per a l'estudi de les comunitats de microorganismes en diferents bioprocessos (Liu *et al.*, 1997; Maestre *et al.* 2009) i ha demostrat ser una metodologia adequada per a l'estudi dels canvis poblacionals al llarg de l'espai i el temps (Kuske *et al.*, 2002). Un dels principals avantatges d'aquesta tècnica és l'alta resolució de separació dels fragments amb patrons diferents gràcies l'electroforesi en capil·lar que es realitza i a la detecció del fragment marcat amb el fluorocrom. A més és possible quantificar les bandes del gel o els pics de l'electroforograma directament. De tota manera la T-RFLP presenta la limitació que no és possible recuperar els fragments de les bandes separades per tal de ser identificades via seqüenciació o hibridació. També cal tenir en compte l'elevat cost de l'equipament necessari, principalment el seqüenciador capil·lar.

v. Anàlisi dels espaiadors intergènics ribosomals (RISA)

Aquesta tècnica es fonamenta en l'amplificació i l'anàlisi de la regió espaiadora intergènica (ISR) existent entre els gens 16S rRNA i 23S rRNA. Aquesta és una regió variable tant en seqüència com en longitud degut a la menor pressió selectiva i les possibles insercions i delecions adquirides durant el procés evolutiu. Les ISR poden ser amplificades per PCR mitjançant el disseny d'encebadors a partir de nucleòtids conservats dels extrems 5' dels gens 23S rRNA i dels extrems 3' dels gens 16S rRNA (García-Martínez *et al.*, 1999). Un avantatge d'aquesta tècnica enfront d'altres aproximacions és que els productes de PCR són resolts directament per longitud en un gel electroforètic d'agarosa, podent recuperar les bandes per a la seva seqüenciació. Per altre costat, una de les limitacions d'aquesta aproximació és la sobrerrepresentació de fragments curts d'ISR i el fet que, la presència de més d'una còpia dels gens ribosomals per un mateix genoma pot generar l'existència de diferents ISR per una mateixa espècie bacteriana (Nocker *et al.*, 2007). No obstant, aquesta tècnica ha estat utilitzada satisfactòriament en l'estudi de comunitats microbianes de mostres de sòls (Hewson i Fuhrman, 2004) així com en sistemes de tractament d'aigües residuals (Castillo-Gonzales i Bruns, 2005).

1.4. ANÀLISIS “BIO-ÒMIQUES” PER A L'ESTUDI DE COMUNITATS MICROBIANES COMPLEXES

Les tècniques de biologia molecular clàssiques, anteriorment descrites, permeten revelar la composició i distribució dels consorcis microbians que es desenvolupen en entorns complexes, incrementant el coneixement sobre la composició de les comunitats microbianes complexes implicades, entre d'altres, en els processos de biofiltració (Maestre *et al.*, 2010). Tot i així, aquests estudis en cap cas permeten establir les interaccions i funcions de les espècies dins de la comunitat de microorganismes d'aquests bioreactors. Per aquesta raó, el paradigma estructura-funció de les comunitats microbianes complexes continua sent un dels majors reptes de l'ecologia microbiana i dels bioprocessos ambientals.

Recentment, gràcies als avenços de les noves plataformes de seqüenciació i a l'enorme capacitat d'anàlisi computacional desenvolupada per a la interpretació de les dades, han aparegut noves aproximacions aplicables en l'estudi de les comunitats microbianes a diferents nivells. Les anomenades “bio-òmiques”, comparteixen, en general, tres grans característiques que contrasten amb les tècniques de biologia molecular clàssiques. A diferència d'aquestes, són metodologies d'alt rendiment, basades en l'anàlisi massiu de dades i amb un enfocament holístic del sistema. En

aquest sentit, l'objectiu de les “bio-òmiques” és considerar els sistemes biològics com a sistemes integrals totals, enlloc de meres col·leccions parcials basades en la informació de seqüència relacionada (Ishi i Tomita, 2009). Sota aquest concepte han aparegut diversos àmbits de recerca com són la genòmica, la transcriptòmica, la proteòmica, la metabolòmica i inclús la interactòmica (Fiehn, 2001; Singh i Nagaraj, 2006; Lin i Qian, 2007; Kandpal *et al.*, 2009) que estudien i consideren cada un dels nivells cel·lulars des d'un punt de vista global i integral del sistema biològic.

Focalitzant l'aplicació d'aquestes anàlisis en la microbiologia ambiental, la metagenòmica permet l'estudi de la diversitat microbiana d'una manera quantitativa, en base a la seqüenciació massiva del conjunt de genomes d'un entorn determinat (Handelsman, 2004; Ghai *et al.*, 2011). De manera similar, l'anàlisi metatranscriptòmica permet contemplar quantitativament l'expressió gènica per a comunitats complexes de manera integral, reflectint l'expressió de la totalitat de gens actius en un moment i condició ambiental concreta (Zhang *et al.*, 2010). Així doncs en base a aquestes anàlisis i l'enorme quantitat d'informació derivada, és possible afrontar l'estudi de les comunitats microbianes des de la perspectiva estructural-funció, revelant importants aspectes de l'ecologia microbiana d'aquestes comunitats.

1.4.1 TECNOLOGIES DE SEQÜENCIACIÓ DE NOVA GENERACIÓ

El mètode de seqüenciació automatitzat de Sanger (Sanger i Coulson, 1975), anomenat així en honor al dos vegades premi Nobel, Frederick Sanger, es considera la base de les tecnologies de seqüenciació de DNA de “primera generació”. Aquesta ha estat la plataforma dominant, durant aproximadament dues dècades, permetent grans avenços en el camp de la genètica i la biologia molecular. Tot i les nombroses millores tècniques acumulades al llarg d'aquesta època, les limitacions dels sistemes automatitzats per seqüenciació de Sanger van demostrar la necessitat de noves i millors tecnologies per a la recerca. En aquest sentit l'estat tecnològic de les plataformes de seqüenciació de DNA ha viscut en els últims deu anys una important revolució focalitzada en l'optimització i millora dels rendiments de lectura d'aquestes tecnologies. Aquest fet ha conduït a l'aparició de noves tecnologies de seqüenciació basades en diferents estratègies, però totes elles generadores d'enormes quantitats de dades d'informació de seqüència acurada d'una manera ràpida i a un baix cost. En certs casos poden arribar a generar més d'un bilió de lectures per reacció. Sens dubte, la disponibilitat d'aquestes tecnologies de nova generació ha canviat la manera de planificar les investigacions i els propis horitzons d'aplicació d'aquestes plataformes, permetent afrontar nous desafiaments en projectes tant diversos com la seqüenciació de genomes (Beller *et al.* 2006), la investigació clínica (Sugarbaker *et*

al., 2008; Kenri *et al.*, 2012), els estudis ambientals (Vila-Costa *et al.*, 2010; Wisniewski-Dyé *et al.*, 2011) i un llarg etcètera de projectes basats en informació de seqüència de DNA.

Les tecnologies de seqüenciació de nova generació inclouen diferents mètodes i procediments que es poden agrupar en termes generals en tres blocs: (1) la preparació de la mostra, (2) la seqüenciació i obtenció de la imatge, (3) i l'anàlisi de les dades. La singularitat de cada un dels protocols específics distingeix cada tecnologia i en determina el tipus de dades obtingudes en cada plataforma. Així doncs, algunes d'aquestes plataformes com *ROCHE/454*, *Illumina/Solexa*, *Life/APG*, *Helicos BioSciences*, *Polonator Instrument Pacific Biosciences* són diferenciables tecnològicament entre si, i per tant comparables en termes de particularitats de seqüenciació i costos (taula 1.5). En part, la coexistència de totes elles depèn d'aquestes característiques tècniques, que diferencien cada plataforma i es tradueixen en certs avantatges en funció de l'aplicació i els objectius del projecte de seqüenciació que es pretén realitzar.

La preparació de la mostra (1) és un dels passos importants en quant a la representativitat de la mostra, evitant el biaix del material genètic a seqüenciar. En la majoria dels casos els mètodes actuals impliquen una fragmentació a l'atzar dels genomes generant bàsicament dues formes de fragments petits, les anomenades "*fragment templates*" i les "*mate-pair templates*". Una característica comuna en totes les plataformes de seqüenciació de nova generació és que la mostra a seqüenciar és immobilitzada o unida a una superfície sòlida o de suport. La immobilització de les mostres separades en l'espai permet la seqüenciació de milers a bilions de reaccions de seqüenciació simultànies.

Amplificació-clonatge de la mostra: La majoria de sistemes d'obtenció d'imatges durant la seqüenciació no són capaços de detectar la fluorescència d'una única molècula, per tant és necessària l'amplificació de la plantilla com a preparació de la mostra. Els dos mètodes més comuns són la PCR en emulsió (emPCR) (Dressman *et al.*, 2003) i l'amplificació en fase sòlida (Fedurco *et al.*, 2006). En el cas de la emPCR després de l'amplificació i enriquiment de les esferes emPCR, aquestes s'immobilitzen en diferents superfícies en funció de la plataforma. En *Polonator Instrument* les emPCR s'immobilitzen en un gel de poliacrilamida sobre la superfície d'un portaobjectes (Shendure *et al.*, 2005), o bé s'uneixen químicament a la superfície d'un vidre recobert amb grups amino, de la mateixa manera que succeeix en la plataforma *Life/APG* (Kim *et al.*, 2007). En la màquina de Roche/454 les esferes emPCR es dipositen directament sobre la *Pico Titer Plate* (Leamon *et al.*, 2003), superfície on es realitza la seqüenciació.

En el cas de l'amplificació en fase sòlida (Illumina/Solexa) es poden generar fins a 200 milions de conjunts de mostres separades en l'espai (Dolan i Denver, 2008), generant un gran nombre d'extrems lliures susceptibles d'hibridació pels encebadors universals de seqüenciació.

Mostra de molècula única: En certs casos específics en que per exemple es disposa de poca quantitat de material genòmic inicial (<1 µg), la preparació de la mostra es pot realitzar seguint una metodologia diferent. Generant plantilles d'una sola molècula de DNA, per mètodes que no requereixen amplificació per PCR (Harris *et al.*, 2008). Aquest fet diferencial pot suposar un clar avantatge en seqüències amb variants genòmiques, al igual que s'eviten els problemes de biaix derivats de l'amplificació per PCR de genomes rics en A-T o G-C. Les plataformes de Helicos BioSciences i de Pacific Biosciences són les úniques capaces de seqüenciar aquesta tipologia de mostres.

Seqüenciació i obtenció d'imatge (2). En funció de si s'ha realitzat una ampliació-clonatge de la mostra, o una preparació de molècula única, els fonaments del mètode de seqüenciació són específics per a cada cas, ja que les estratègies d'obtenció d'imatges seran diferents entre elles. Referent a la química de la seqüenciació la majoria de mètodes es basen en seqüenciació per síntesi, tot i així, alguna plataforma utilitza la seqüenciació per lligació (SBL), una aproximació en que la DNA polimerasa és substituïda per una DNA ligasa. En termes de seqüenciació per síntesi, els mètodes es poden classificar en terminació cíclica reversible (TCR), addició de nucleòtid (AN) i seqüenciació a temps real (STR).

Com el propi nom indica, la seqüenciació per TCR utilitza terminadors reversibles en una metodologia cíclica que condueix a la incorporació de nucleòtids, seguida per la generació d'una senyal fluorescent i l'escissió final tancant el cicle (fig. 1.15). La clau del mètode TCR són els terminadors reversibles. Alguns exemples de terminadors reversibles utilitzats satisfactòriament en seqüenciació per TCR són els terminadors 3'-O-aliil-2'-desoxiribonucleòsid trifosfat (dNTPs) (Ju *et al.*, 2006) i 3'-O-azidometil-dNTPs (Guo *et al.*, 2008).

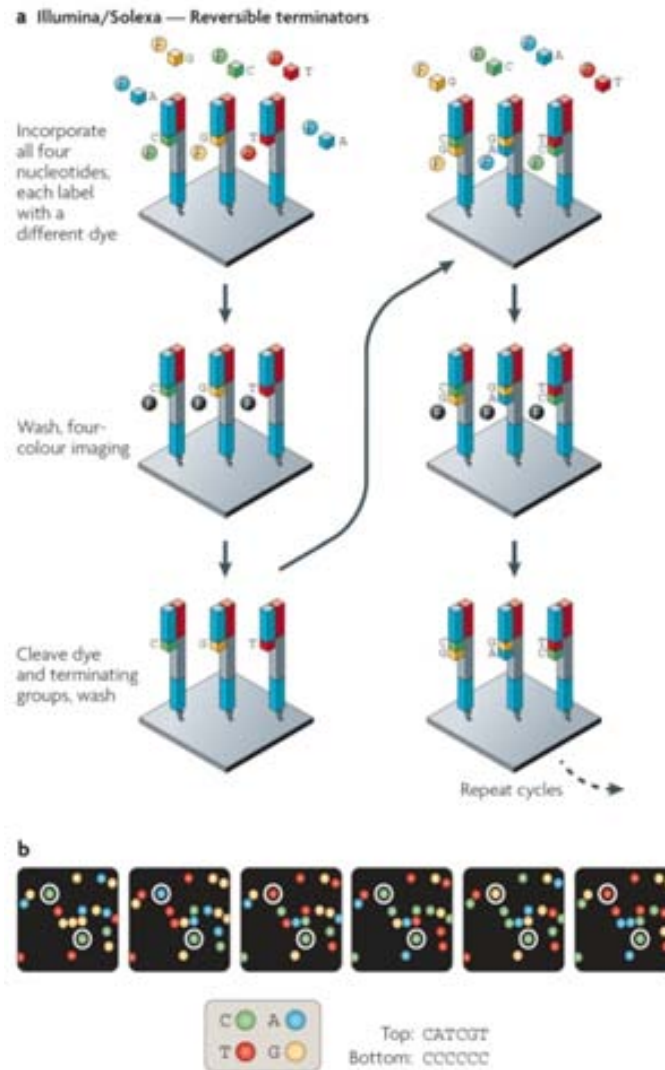


Fig. 1.15 a) Seqüenciació per TCR amb quatre colors, mètode utilitzat per la plataforma Illumina/Solexa. Amplificació en fase sòlida. Després del rentat dels nucleòtids no incorporats, es regeneren els grups 3'-OH amb un agent reductor tris(2)-carboxyethyl phosphine (TCEP) per tal de permetre els cicles posteriors. b) La generació d'imatge permet identificar quin dels nucleòtids s'ha incorporat en cada posició generant lectures mitjanes de 45 pb. L'error més freqüent en aquesta plataforma de seqüenciació són les substitucions.

Un altre mètode de seqüenciació cíclic similar al TCR és la SBL que utilitza una DNA ligasa (Tomkinson *et al.*, 2006) conjuntament amb sondes marcades fluorescentment. Les sondes estant basades en una única base codificant (o dues com a màxim) complementades per bases degenerades i bases universals. El cicle s'inicia amb la hibridació de la sonda marcada fluorescentment amb la seva regió complementària. Es llavors quan la DNA ligasa actua unint la sonda al primer fixant la sonda específica complementària a la plantilla. D'aquesta manera es determina la identitat de la sonda lligada mitjançant la fluorescència de la pròpia sonda. El cicle finalitza amb l'alliberació del marcador fluorescent regenerant el grup 5'-PO₄ permeten posteriors cicles de lligació (fig. 1.16) .

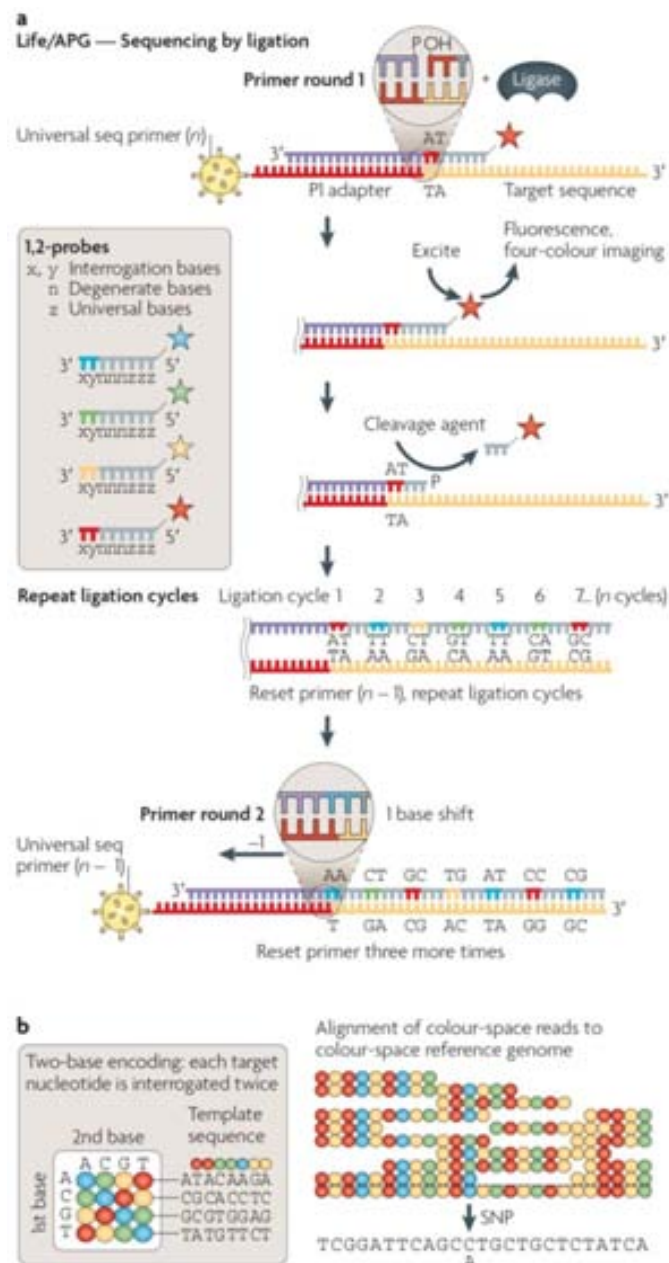


Fig. 1.16 a) Seqüenciació per lligació de la plataforma Life/APG d'Applied Biosystems. Posteriorment a la unió del encebador universal (n) s'afegeix una llibreria de sondes fluorescentment marcades amb els nucleòtids candidats a la lligació. La lligació pot ser bidireccional tant, 5'-PO₄ com 3'-OH, i es realitza sota condicions favorables per la selectiva hibridació. Després de la lligació i obtenció de la imatge, s'allibera el marcador fluorescent regenerant l'extrem 5'-PO₄. El cicle d'hibridació, lligació, generació imatge i regeneració es repeteix n-cicles. Posteriorment, l'encebador extens per lligació és alliberat i es repeteix una segona ronda de lligació amb un altre encebador (n-1), de manera que es confirma la base lligada una posició a l'esquerra. D'aquesta forma cada base és sondejada dues vegades augmentant la fiabilitat de la seqüència. Les sondes de lligació són dissenyades per tal de determinar la primera (x) i segona (y) posició contigües de la sonda hibridada, per tant 16 dinucleòtids possibles marcats fluorescentment són usats. b) Esquema codificant de 2 bases, les 4 seqüències de dinucleòtids estan associades a una coloració (AA, CC, GG i TT són codificats pel color blau). Cada seqüència és interrogada dues vegades recollint la senyal fluorescent generada. Les lectures de color són alineades amb un genoma de referència i descodificades en seqüència d' DNA.

La seqüenciació per AN o també referida com a piroseqüenciació consisteix en un mètode no electroforètic bioluminescent que mesura l'alliberació de pirofosfat convertint la mesura en llum visible mitjançant reaccions enzimàtiques (Ronaghi *et al.*, 1996 i 1998). A diferència d'altres metodologies que utilitzen nucleòtids modificats per interrompre la síntesi de DNA, el mètode de piroseqüenciació (fig. 1.17) es basa en l'activitat de la DNA polimerasa mitjançant l'addició de dNTPs en condicions limitants. La plataforma de piroseqüenciació comercialitzada per Roche/454 utilitza les mostres de DNA en emPCR, seqüenciant simultàniament de 1-2 milions d'esferes emPCR dipositades en els forats de la *Pico Titer Plate* (PTP). Cada petita esfera emPCR té unida a la seva superfície sulfurilases i luciferases que permeten la generació de llum. Una vegada distribuïdes totes les esferes emPCR pels pouets de la PTP, la piroseqüenciació s'inicia amb l'addició individual de dNTPs en cada pouet de manera predeterminada i amb un ordre seqüencial. La bioluminescència és registrada amb un dispositiu localitzat a la base dels pouets, de manera que la llum generada per la cascada enzimàtica es transforma en una sèrie de pics del PP_i flowgram. En repeticions d'homopolímers durant la síntesi, el nombre de dNTPs afegits és directament proporcional a la senyal llumínica generada. Recentment, millores de disseny, com la cobertura de titani en la PTP ha permès augmentar considerablement la longitud de les lectures i la qualitat de les dades, reduint el creuament entre pouets adjacents.

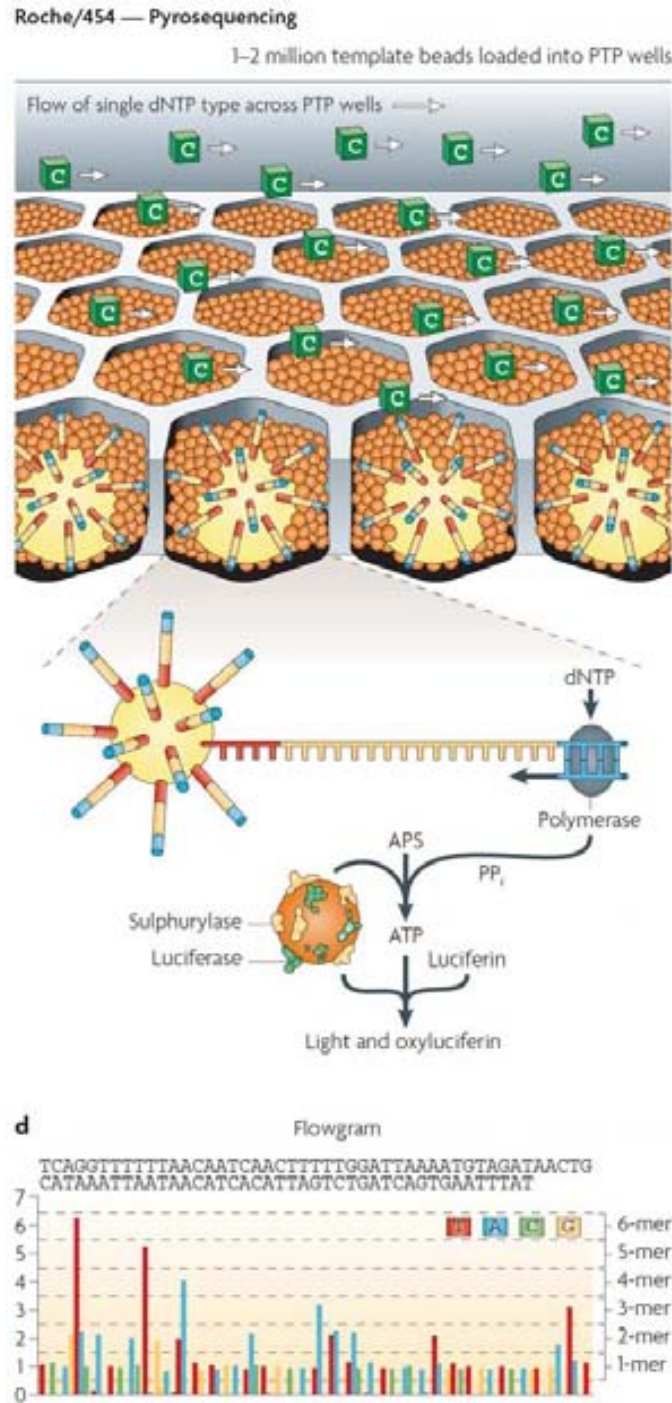


Fig. 1.17 Piroseqüenciació de la plataforma de Roche/454. Després de carregar les perles amb el DNA amplificat en els pouets de la placa PTP, s'afageixen les petites esferes transportadores de les sulfurilases i luciferases. A la imatge únicament es mostra l'exemple per a un sol tipus de dNTP (citosina). La PTP està muntada sobre una cambra de fluxe que permet la incorporació seqüencial dels reactius a cada pouet on es dur a terme la reacció. A la part inferior de la placa, sota cada pouet, mitjançant fibra òptica i un dispositiu d'alta resolució acoblat és possible detectar i registrar la llum generada per a cada nucleòtid afegit. El pirofosfat (PPi) alliberat en la síntesi, es converteix a ATP alliberant llum de l'oxidació de la luciferina a oxiluciferina. La llum generada per la cascada enzimàtica és registrada en forma de gràfic on cada dNTP afegit és proporcional a la senyal llumínica registrada. La mitjana de les lectures és al voltant de 400 pb i l'error més freqüent són les insercions.

A diferència dels terminadors reversibles que aturen cíclicament la síntesi de DNA, el mètode de seqüenciació STR, desenvolupat per la companyia *Pacific Biosciences* (Eid *et al.*, 2009) basa el fonament d'aquesta tecnologia, en la síntesi contínua de DNA mitjançant la incorporació de nucleòtids marcats que generen imatges al mateix temps de la síntesi del DNA (Metzker, 2009). En la plataforma de *Pacific Biosciences*, una única molècula de DNA polimerasa és immobilitzada a la superfície del fons de cada “zero-mode waveguide detector” (ZMW detector) (Levene *et al.*, 2003), de manera que la informació de seqüència s'obté en funció de la fosfo-unió dels nucleòtids incorporats al encebador de la cadena en síntesi (fig.1.18)

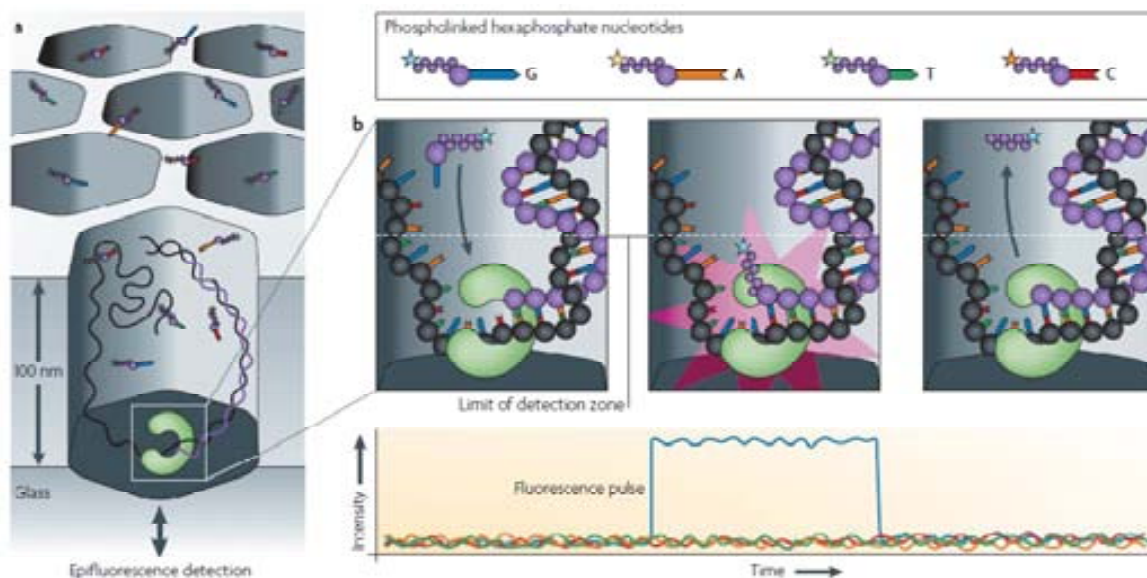


Figura 1.18. Seqüenciació en temps real. Es mostra el mètode de seqüenciació STR amb 4 colors de Pacific Biosciences. a) ZMW detector redueix el volum d'observació de la seqüenciació, minimitzant la presència de possibles nucleòtids marcats en la zona de detecció que recull la fluorescència. b) El temps de residència dels nucleòtids fosfo-units al lloc actiu, ve definit pel rendiment de la polimerasa, i típicament correspon a una escala de milisegons. El pols de fluorescència ve donat pel període en que el fluoròfor fosfo-unit al nucleòtid ocupa el límit de detecció del detector ZMW.

Probablement una de les tecnologies de seqüenciació més innovadores i prometedores, i a la vegada distant dels mètodes presentats, és la tecnologia de seqüenciació basada en nanoporus de la companyia *Oxford Nanopore Technologies*. La gran versatilitat d'anàlisi d'aquesta tecnologia permet la descripció de molècules de DNA, RNA i inclús proteïnes (Branton *et al.*, 2008; Olasagasti *et al.*, 2010). Respecte a la seqüenciació de DNA per nanoporus existeixen dues aproximacions diferenciades en el mètode de translocació del DNA a través del nanoporus. Per un costat hi ha el mètode de seqüenciació per cadena, que va seqüenciant en temps real a mesura que va transposant una de les cadenes de DNA a través de la proteïna nanoporus, i per altre costat hi ha el mètode de seqüenciació per exonucleasa que va seqüenciant a temps real a mesura que van fluint els nucleòtids individuals a través

del nanoporus degut a l'acció d'una exonucleasa ubicada a un costat del nanoporus. Aquesta innovadora tecnologia de seqüenciació encara es troba en fase de desenvolupament, tot i que ja s'ha anunciat la seva comercialització durant l'any 2012 en les anomenades plataformes GridION i MinION, aquesta última en forma de dispositiu portàtil USB.

L'aparició de noves plataformes de seqüenciació és una evidència de la revolució tecnològica al voltant d'aquesta nova generació de seqüenciadors de DNA, de manera que en funció dels objectius de recerca és necessari analitzar i valorar les prestacions i característiques de cada plataforma en qüestió, per tal d'utilitzar la plataforma que més s'adeqüi a les necessitats del projecte.

Taula 1.5. Comparativa de les tecnologies de seqüenciació de nova generació. (taula adaptada Metzker, 2009).

Plataforma	Llibreria/ Preparació de la mostra	Química de la Seqüenciació	Longitud de lectura (bases)	Temps de reacció (dies)	Cost de la màquina	Pros	Contres
ROCHE/454' GS FLX Titanium	Fagmentació senzilla / MP fragments. PCR en emulsió	Pyrosequenciació	330*	0.35	500,000	Lectures llargues, bona assignació en zones repetitives, ràpid temps de seqüenciació	Alts costos reactius, Altes taxes d'errors en repeticions d'homopolímers
Illumina/ Solexa's GAII	Fagmentació senzilla / MP fragments. Amplificació en fase sòlida	Terminadors reversibles	75	4*, 9*	540,000	Una de les plataformes més utilitzades	Baixa capacitat de multiplexació de les mostres
Life/APG's SOLID 3	Fagmentació senzilla / MP fragments. PCR en emulsió	Sequenciació per lligació (sondes escindibles)	50	7*, 14*	595,000	Dues bases de codificació, ofereix correcció d'errors inherents	Requereix llargs temps de reacció
Polonator G.007	MP fragments. PCR en emulsió	Sequenciació per lligació (sondes no escindibles)	26	5	170,000	Plataforma més econòmica; de codi obert per adaptar-hi alternatives de seqüenciació	Continus controls de qualitat dels reactius. La menor longitud de lectures
Helicos BioSciences HeliScope	Fagmentació senzilla / MP fragments. Molècula única	Terminadors reversibles	32*	8*	999,000	No presenta desviacions basades en la seqüència motlle	Altes taxes d'error comparades amb altres tecnologies basades en terminadors reversibles
Pacific Biosciences	Fagmentació senzilla. Molècula única	Tecnologia "single molecule real time" (SMRT), PacBio RS	964*	0.02*	695,000	Té el major potencial de lectura amb el mínim temps de seqüenciació. Baixos costos de seqüenciació.	Presenta altes taxes d'errors comparades amb altres plataformes.

♣ Mitjana de la longitud de les lectures. ♦ Temps seqüenciació. ♠ Temps preparació mostra.

Alineament i assemblatge de seqüències (3). Posteriorment a la generació de les lectures, en totes les plataformes seqüenciació, és necessari realitzar l'alineament de les seqüències. Existeixen principalment dues aproximacions per tal de reconstruir la configuració de seqüència original a partir de les dades crues de la seqüenciació. Una d'elles és mitjançant la comparació amb bases de dades conegudes (Trapnell i Salzberg, 2009) i l'altre mitjançant l'assemblatge *de novo* (Chaisson *et al.*, 2008) a partir de la reconstrucció de seqüència. La decisió a l'hora d'escollir l'estratègia adequada es basa principalment en l'objectiu biològic pretès, l'existència de seqüències prèvies iguals o similars a les obtingudes, però també entren a consideració els costos i esforços necessaris per obtenir l'aplicació final.

Respecte a l'aproximació per alineament de seqüències, existeixen algunes limitacions com per exemple l'alineament de regions repetitives dins el genoma de referència (Frazer *et al.*, 2009). Aquestes situacions poden generar variabilitat de variants estructurals entre el genoma de referència i el genoma analitzat. Aquestes limitacions però es poden minimitzar des d'un punt de vista preventiu durant la preparació de la mostra inicial, ja que amb lectures "mate-pair" s'afavoreix la qualitat de l'alineament posterior (Korbel *et al.*, 2007).

L'assemblatge *de novo* ha estat l'estratègia d'elecció per a la seqüenciació de genomes bacterians i cromosomes bacterians artificials (Hernandez *et al.*, 2008), tot i així la seva aplicació en genomes humans té reptes importants a solucionar. En aquest sentit, una forma de millorar la qualitat de l'alineament o assemblatge de les lectures en projectes *de novo*, és augmentar la cobertura de seqüenciació de la mostra facilitant el càlcul computacional (Harismendy *et al.*, 2009).

1.4.2 BASES DE DADES I BIOINFORMÀTICA

L'aparició de les plataformes de seqüenciació de nova generació i la subsegüent producció de milers de milions de seqüències de DNA ha qüestionat la infraestructura dels sistemes d'informació existents en termes de transferència de dades, emmagatzematge, qualitat i control de les seqüències obtingudes. Els avenços en bioinformàtica estan essent una realitat necessària i imprescindible per a mantenir el constant creixement de la informació de seqüència generada, així com per a optimitzar els sistemes d'anàlisi computacional per a l'alineament i assemblatge de les lectures en les bases de dades disponibles.

Els sistemes d'informació existents, s'estructuren en diferents bases de dades públiques com GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), DOE Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov/>), EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>) o DDBJ

(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>), que emmagatzemen les dades generades de manera interconnectada facilitant la cerca d'informació de forma creuada. No obstant, la funcionalitat d'aquestes bases de dades públiques, no es redueix a la simple concentració i acumulació de dades experimentals per a la consulta individual, sinó que el conjunt de projectes "omics" desenvolupats i la necessitat d'analitzar conjuntament aquestes dades mitjançant sofisticades eines computacionals, fan que les diferents bases de dades existents s'usin a més, com a eines d'anàlisi i interpretació de dades en els nous projectes experimentals que es desenvolupen (Waters *et al.*, 2006). En aquest sentit diversos programaris com MEGAN (Huson *et al.*, 2011; <http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan/>), Galaxy (Goecks *et al.*, 2010; <http://main.g2.bx.psu.edu/>) o Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005; <http://www.blast2go.com/>) són algunes de les estratègies usades en l'anotació de dades experimentals de projectes "omics". De manera similar, s'han creat diferents projectes informàtics estructurats al voltant de bases de dades específiques interconnectades, que permeten categoritzar i analitzar dades experimentals des de diferents objectius finals. Així per exemple, el projecte bioinformàtic d'ExpASY (SIB, Swiss Institute of Bioinformatics; <http://expasy.org/>) engloba diferents aplicacions i bases de dades per a l'anàlisi bioinformàtic individual així com col·lectiu; el projecte Gene Ontology, GO (Ashburner *et al.*, 2000; <http://www.geneontology.org/>) permet la descripció de seqüències en base l'anàlisi ontològica i el projecte KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <http://www.genome.jp/kegg/>) engloba importants dipòsits públics de dades biològiques per a la caracterització específica de seqüències des de diferents categories d'informació (Kanehisa *et al.*, 2011). Un altre exemple de nous recursos bioinformàtics és el PARE (Protein Abundance and mRNA Expression), projecte configurat a partir de diferents base de dades i centrat en la determinació de les correlacions globals entre dades transcriptòmiques i informació proteòmica (Yu *et al.*, 2007).

Així doncs, a partir de l'enorme quantitat d'informació de seqüència disponible, estructurada i dipositada en diferents bases de dades en funció de l'objectiu d'estudi, és possible interpretar les dades de seqüència en base a una gran varietat de recursos i objectius. En aquest sentit, les diferents eines computacionals disponibles permeten la identificació i interpretació de les dades segons la correlació global de les seqüències a partir de l'anàlisi de concordança a diferents nivells entre els conjunts de dades heterogènies de les respectives bases de dades. No obstant, la gran majoria dels repositoris públics no estan equipats amb suficients recursos estadístics per a l'anàlisi integratiu entre diferents bases de dades. En aquest sentit, els esforços en desenvolupament i millora es centren en la necessitat d'incorporar nous mètodes computacionals i eines especialitzades per a l'anàlisi integrativa dels diferents

repositoris (Zhang *et al* 2010). Així doncs, el repte dels sistemes d'informació existents passa per la necessitat de convertir la interconnexió de les diferents bases de dades en sistemes d'anàlisi integratius de la totalitat d'informació. De fet, bona part de la proliferació i èxit dels futurs projectes basats en informació de seqüència mitjançant plataformes de seqüenciació de nova generació, dependrà de la capacitat d'anàlisi existent a partir de la infraestructura dels propis repositoris públics.

1.6. REFERÈNCIES

- Abatzoglou, N., Boivin, S. (2009) A review of biogas purification processes. *Biofuels, bioproducts and biorefining*, 3, 42-71.
- Ahlborg, G. (1951) Hydrogen sulfide poisoning in shale oil industry. *Archives of Industrial Hygiene and Occupational Medicine*, 3:247-266.
- Amann, R., Fuchs, B.M., (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques, *Nat Rev Micro* 6, pp. 339-348.
- Amann, R., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 59: 143-169.
- Amoore, J.E., Hautala, E., (1983). Odor as an aid to chemical safety: Odor thresholds compared with threshold limit values and volatilities for 214 industrial chemicals in air and water dilution, *J. Appl. Toxicol.* 3, pp. 272-290.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G., (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology, *Nat Genet* 25, pp. 25-29.
- Avaniss-Aghajani, E., J.K. Chapman, D., Brunk, C. (1994) A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences. *BioTechniques* 17:144-149.
- Barrett, E., Clark, M.A. (1987) Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate. *Microbiological reviews* 51: 192-205.
- Beauchamp, R.O.Jr., Bus, J.S., Popp, J.A., Boreiko, C.J., Andjelkovich, D.A. (1984) A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 13:25-97.
- Beller, H.R., Letain, T.E., Chakicherla, A., Kane, S.R., Legler, T.C., Coleman, M.A., (2006). Whole-Genome Transcriptional Analysis of Chemolithoautotrophic Thiosulfate Oxidation by *Thiobacillus denitrificans* under Aerobic versus Denitrifying Conditions, *J. Bacteriol.* 188, pp. 7005-7015.
- Bhambhani, Y., Singh, M. (1991) Physiological effects of hydrogen sulfide inhalation during exercise in healthy men. *Journal of Applied Physiology*, 71:1872-1877.
- Bhambhani, Y., Burnham, R., Snyder, G., MacLean, I., Martin, T. (1996) Effects of 5 ppm hydrogen sulfide inhalation on biochemical properties of skeletal muscle in exercising men and women. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 57:464-468.
- Bhambhani, Y., Burnham, R., Snyder, G., MacLean, I. (1997) Effects of 10-ppm hydrogen sulfide inhalation in exercising men and women. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 39:122-129.
- Bossio, D.A., Scow, K.M. (1998) Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microb Ecol* 35 :265-278.
- Branton, D., Deamer, D.W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S.A., Butler, T., Di Ventra, M., Garaj, S., Hibbs, A., Huang, X., Jovanovich, S.B., Krstic, P.S., Lindsay, S., Ling, X.S., Mastrangelo, C.H.,

- Meller,A., Oliver,J.S., Pershin,Y.V., Ramsey,J.M., Riehn,R., Soni,G.V., Tabard-Cossa,V., Wanunu,M., Wiggan,M., Schloss,J.A., (2008). The potential and challenges of nanopore sequencing, *Nat Biotech* 26, pp. 1146-1153.
- Britschgi,T.B., and Giovannoni,S.J. (1991) Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1707-1713.
- Brüser,T., Lens,P.N.L., Trüper,H.G. (2004) The biological sulfur cycle. In: Environmental technologies to treat sulfur pollution. *Principles and engineering*, Lens, P.; Hulshoff Pol, L., Eds. IWA Publishing: London, UK, 47-86.
- Castillo-Gonzalez,H.A., Bruns,M.A., (2005). Dissimilatory Iron Reduction and Odor Indicator Abatement by Biofilm Communities in Swine Manure Microcosms, *Appl. Environ. Microbiol.* 71, pp. 4972-4978.
- Chaisson,M.J., Brinza,D., Pevzner,P.A., (2008). De novo fragment assembly with short mate-paired reads: Does the read length matter?, *Genome Research*. 19: 336-346
- Cho,K.S., Hirai,M., Shoda,M. (1991) Removal of dimethyl disulfide by the peat seeded with night soil sludge. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71, 289-291.
- Chung,Y.C., Huang,C., Tseng,C.P. (1996) Operation optimization of Thiobacillus thioparus CH11 biofilter for hydrogen sulfide removal. *Journal of Biotechnology*, 52, (1), 31-38.
- CICAD 53 (2003).Hydrogen sulfide: Human health aspects. Geneva, World Health Organization.
- Cohen,Y., Gurevitz,M., (2006). The Cyanobacteria-Ecology, Physiology and Molecular Genetics. *The Prokaryotes*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt (Eds.). Springer New York, pp. 1074-1098.
- Cole,J.R., Wang,Q., Cardenas,E., Fish,J., Chai,B., Farris,R.J., Kulam-Syed-Mohideen,A.S., McGarrell,D.M., Marsh,T., Garrity,G.M., Tiedje,J.M., (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis, *Nucleic Acids Research* 37, p. D141-D145.
- Conesa,A., Götz,S., García-Gómez,J.M., Terol,J., Talón,M., Robles,M., (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research, *Bioinformatics* 21, pp. 3674-3676.
- Connaughton,S., Collins,G., O'Flaherty,V., (2006). Development of microbial community structure and activity in a high-rate anaerobic bioreactor at 18°C, *Water Research* 40, pp. 1009-1017.
- Cox, H. H. J.; Deshusses, M.A. (2002) Co-treatment of H₂S and toluene in a biotrickling filter. *Chemical Engineering Journal*,87, 101-110.
- Dahl,C., Engels,S., Pott-Sperling,A.S., Schulte,A., Sander,J., Lubbe,Y., Deuster,O., Brune,D.C., (2005). Novel Genes of the dsr Gene Cluster and Evidence for Close Interaction of Dsr Proteins during Sulfur Oxidation in the Phototrophic Sulfur Bacterium *Allochromatium vinosum*, *J. Bacteriol.* 187, pp. 1392-1404.
- Daims,H., Bruhl,A., Amann,R., Schleifer,K., Wagner,M. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 434-444.
- Delbès,C., Moletta,R., Godon,J.-J., (2000). Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis, *Environmental Microbiology* 2, pp. 506-515.
- Delhomenie,M.C., Bibeau,L., Gendron,J., Brzezinski,R., and Heitz,M. (2003) A study of clogging in a biofilter treating toluene vapors. *Chemical Engineering Journal* 94: 211-222.
- Delhomenie,M.C., Heitz,M. (2005) Biofiltration of air: A review. *Critical Reviews in Biotechnology* 25: 53-72.
- Devinny,J.S., Deshusses,M.A., Webster,T.S. (1999) Biofiltration for Air Pollution Control. CRC-Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA.

- Dolan, P., Denver, D., (2008). TileQC: A system for tile-based quality control of Solexa data, *BMC Bioinformatics* 9, p. 250-260.
- Dorigo, U., Volatier, L., Humbert, J.F., (2005). Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities, *Water Research* 39, pp. 2207-2218.
- Dragt, A.J., (1992). Opening address. A: Biotechniques for air pollution abatement and odour control policies. Amsterdam, Holanda
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., (2003). Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, pp. 8817-8822.
- Duan, H., Koe, L.C.C., Yan, R. (2005) Treatment of H₂S using a horizontal biotrickling filter based on biological activated carbon: reactor start-up and performance evaluation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 143-149.
- Duan, H., Koe, L.C.C., Yan, R., Chen, X. (2006) Biological treatment of H₂S using pellet activated carbon as a carrier of microorganisms in a biofilter. *Water Research*, 40, 2629-2636.
- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B., Bibillo, A., Bjornson, K., Chaudhuri, B., Christians, F., Cicero, R., Clark, S., Dalal, R., deWinter, A., Dixon, J., Foquet, M., Gaertner, A., Hardenbol, P., Heiner, C., Hester, K., Holden, D., Kearns, G., Kong, X., Kuse, R., Lacroix, Y., Lin, S., Lundquist, P., Ma, C., Marks, P., Maxham, M., Murphy, D., Park, I., Pham, T., Phillips, M., Roy, J., Sebra, R., Shen, G., Sorenson, J., Tomaney, A., Travers, K., Trulson, M., Vieceli, J., Wegener, J., Wu, D., Yang, A., Zaccarin, D., Zhao, P., Zhong, F., Korf, J., Turner, S., (2009). Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules, *Science* 323, pp. 133-138.
- Fedurco, M., Romieu, A., Williams, S., Lawrence, I., Turcatti, G. (2006) BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies, *Nucleic Acids Research* 34, p. e22.
- Fiehn, O., (2001). Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks, *Comp Funct Genomics* 2, pp. 155-168.
- Findlay, R.H., (1996) The use of phospholipid fatty acids to determine microbial community structure. *Mol Microb Ecol Man* 4:1-17
- Fortuny, M., Baeza, J.A., Gamisans, X., Casas, C., Lafuente, J., Deshusses, M.A., and Gabriel, D. (2008) Biological sweetening of energy gases mimics in biotrickling filters. *Chemosphere* 71: 10-17.
- Frazer, K.A., Murray, S.S., Schork, N.J., Topol, E.J., (2009). Human genetic variation and its contribution to complex traits, *Nat Rev Genet* 10, pp. 241-251.
- Friedrich, C.G., (1998). Physiology and Genetics of Sulfur-oxidizing Bacteria. In: R. K. Poole (Eds.). *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 235-289.
- Friedrich, C.G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A., Fischer, J., (2001). Oxidation of Reduced Inorganic Sulfur Compounds by Bacteria: Emergence of a Common Mechanism?, *Appl. Environ. Microbiol.* 67, pp. 2873-2882.
- Friedrich, C.G., Quentmeier, A., Bardischewsky, F., Rother, D., Kraft, R., Kostka, S., Prinz, H., (2000). Novel Genes Coding for Lithotrophic Sulfur Oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB17, *J.Bacteriol.* 182, pp. 4677-4687.
- Friedrich, C.G., Quentmeier, A., Bardischewsky, F., Rother, D., Orawski, G., Hellwig, P., Fischer, J., (2008). Redox Control of Chemotrophic Sulfur Oxidation of *Paracoccus pantotrophus*. *Microbial Sulfur Metabolism*. In: C. Dahl and C. G. Friedrich (Eds.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 139-150.
- Friedrich, C.G., Bardischewsky, F., Rother, D., Quentmeier, A., Fischer, J., (2005). Prokaryotic sulfur oxidation, *Current Opinion in Microbiology* 8, pp. 253-259.
- Gabriel, D., Deshusses, M.A. (2003). Retrofitting existing chemical scrubbers to biotrickling filters for H₂S emission control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, 100, (11), 6308-6312.

- García-Martínez, J., Acinas, S.G., Anón, A.I., Rodríguez-Valera, F., (1999). Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity, *Journal of Microbiological Methods* 36, pp. 55-64.
- Ghai, R., Rodríguez-Valera, F., McMahon, K.D., Toyama, D., Rinke, R., Cristina Souza de Oliveira, T., Wagner Garcia, J., Pellon de Miranda, F., Henrique-Silva, F., (2011). Metagenomics of the Water Column in the Pristine Upper Course of the Amazon River, *PLoS ONE* 6, p. e23785.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L., Field, K.G., (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton, *Nature* 345, pp. 60-63.
- Goecks, J., Nekrutenko, A., Taylor, J., The Galaxy Team, (2010). Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences, *Genome Biology* 11, p. R86.
- Green, C.T., Scow, K.M., (2000). Analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers, *Hydrogeology Journal* 8, pp. 126-141.
- Gregersen, L.H., Bryant, D.A., Frigaard, N.U., (2011) Mechanisms and evolution of oxidative sulfur metabolism in green sulfur bacteria. *Front Microbiol* 2: 116.
- Guo, J., Xu, N., Li, Z., Zhang, S., Wu, J., Kim, D.H., Sano Marma, M., Meng, Q., Cao, H., Li, X., Shi, S., Yu, L., Kalachikov, S., Russo, J.J., Turro, N.J., Ju, J., (2008). Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, pp. 9145-9150.
- Handelsman, J., (2004). Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, pp. 669-685.
- Harismendy, O., Ng, P., Strausberg, R., Wang, X., Stockwell, T., Beeson, K., Schork, N., Murray, S., Topol, E., Levy, S., Frazer, K., (2009). Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies, *Genome Biology* 10, p. R32.
- Harris, T.D., Buzby, P.R., Babcock, H., Beer, E., Bowers, J., Braslavsky, I., Causey, M., Colonell, J., DiMeo, J., Efcavitch, J.W., Giladi, E., Gill, J., Healy, J., Jarosz, M., Lapen, D., Moulton, K., Quake, S.R., Steinmann, K., Thayer, E., Tyurina, A., Ward, R., Weiss, H., Xie, Z., (2008). Single-Molecule DNA Sequencing of a Viral Genome, *Science* 320, pp. 106-109.
- Hernandez, D., François, P., Farinelli, L., Østerås, M., Schrenzel, J., (2008). De novo bacterial genome sequencing: Millions of very short reads assembled on a desktop computer, *Genome Research*. 18: 802-809
- Herrygers, V., van Lagenhove, H., Smet, E. (2004) Biological treatment of gases polluted by volatile sulfur compounds. In: Environmental technologies to treat sulfur pollution. *Principles and engineering*, Lens, P.; Hulshoff Pol, L., Eds. IWA Publishing: London, UK, 281-304.
- Hewson, I., Fuhrman, J.A., (2004). Richness and Diversity of Bacterioplankton Species along an Estuarine Gradient in Moreton Bay, Australia, *Appl. Environ. Microbiol.* 70, pp. 3425-3433.
- Hirai, M., Ohtake, M., Shoda, M. (1990) Removal kinetics of hydrogen sulfide, methanethiol and dimethyl sulfide by peat biofilters. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70, (5), 334-339.
- Hirsch, A.R., Zavala, G. (1999) Long term effects on the olfactory system of exposure to hydrogen sulphide. *Occupational and Environmental Medicine*, 56:284-287.
- Huber, H., Prangishvili, D., (2006). Sulfolobales. *The Prokaryotes*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt (Eds.). Springer New York, pp. 23-51.
- Huson, D.H., Mitra, S., Ruscheweyh, H.J., Weber, N., Schuster, S.C., (2011). Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4, *Genome Research* 21, pp. 1552-1560.
- Imhoff, J., (2006). The Family Ectothiorhodospiraceae. *The Prokaryotes*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt (Eds.). Springer New York, pp. 874-886.
- IPCS (1981) Hydrogen sulfide. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 19).

- Ishii,N., Tomita,M., (2009). Multi-Omics Data-Driven Systems Biology of *E. coli*. *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli*. In: S. Y. Lee (Eds.). Springer Netherlands, pp. 41-57.
- Jappinen,P., Vilkkä,V., Marttila,O., Haahtela,T. (1990) Exposure to hydrogen sulphide and respiratory function. *British Journal of Industrial Medicine*, 47:824–828.
- Ju,J., Kim,D.H., Bi,L., Meng,Q., Bai,X., Li,Z., Li,X., Marma,M.S., Shi,S., Wu,J., Edwards,J.R., Romu,A., Turro,N.J., (2006). Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, pp. 19635-19640.
- Jubany,I., Lafuente,J., Carrera,J., Baeza,J.A., (2009). Automated thresholding method (ATM) for biomass fraction determination using FISH and confocal microscopy, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, pp. 1140-1145.
- Kandpal,R., Saviola,B., Felton,J. (2009). The era of omics unlimited. *Biotechniques* 46, 351–355.
- Kanehisa,M., Goto,S., Sato,Y., Furumichi,M., Tanabe,M., (2011). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets, *Nucleic Acids Research. Volume* 40, Issue D1 Pp. D109-D114
- Kasakura,T., Tatsukawa,K. (1995) Treatment of H₂S-containing gases: a review of microbiological alternatives. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, (1), 2-10.
- Kelly,D.P., Harrison,A.P., (1989) Genus Thiobacillus. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. (eds.: Murray, R.G.E., Brenner, D.J., Holt, J.G., Krieg, N.R., Moulder, J.W., Pfennig, N., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T.) Williams and Wilkins. Baltimore.
- Kelly,D.P., Shergill,J.K., Lu,W.P., Wood,A.P., (1997). Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek* 71, pp. 95-107.
- Kennes,C., Veiga,M.C., (2001) Bioreactors for Waste Gas Treatment. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, The Netherlands.
- Kennes,C.; Thalasso, F. (1998). Waste gas biotreatment technology. *J. Chem. Technol.Biot.* 72: 303-319.
- Kenri,T., Horino,A., Matsui,M., Sasaki,Y., Suzuki,S., Narita,M., Ohya,H., Okazaki,N., Shibayama,K., (2012). Complete Genome Sequence of Mycoplasma pneumoniae Type 2a Strain 309, Isolated in Japan, *Journal of Bacteriology* 194, pp. 1253-1254.
- Kim,J.B., Porreca,G.J., Song,L., Greenway,S.C., Gorham,J.M., Church,G.M., Seidman,C.E., Seidman,J.G., (2007). Polony Multiplex Analysis of Gene Expression (PMAGE) in Mouse Hypertrophic Cardiomyopathy, *Science* 316, pp. 1481-1484.
- Kitts,C.L. (2001) Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 2: 17-25.
- Kletzin,A., (2008). Oxidation of Sulfur and Inorganic Sulfur Compounds in *Acidianus ambivalens*. *Microbial Sulfur Metabolism*. In: C. Dahl and C. G. Friedrich (Eds.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 184-201.
- Korbel,J.O., Urban,A.E., Affourtit,J.P., Godwin,B., Grubert,F., Simons,J.F., Kim,P.M., Palejev,D., Carriero,N.J., Du,L., Taillon,B.E., Chen,Z., Tanzer,A., Saunders,A.C.E., Chi,J., Yang,F., Carter,N.P., Hurles,M.E., Weissman,S.M., Harkins,T.T., Gerstein,M.B., Egholm,M., Snyder,M., (2007). Paired-End Mapping Reveals Extensive Structural Variation in the Human Genome, *Science* 318, pp. 420-426.
- Kuske,C.R., Ticknor,L.O., Miller,M.E., Dunbar,J.M., Davis,J.A., Barns,S.M., Belnap,J., (2002). Comparison of Soil Bacterial Communities in Rhizospheres of Three Plant Species and the Interspaces in an Arid Grassland, *Appl. Environ. Microbiol.* 68, pp. 1854-1863.
- Lagas,J.A. (2004). Survey of H₂S and SO₂ removal processes. In: Environmental technologies to treat sulfur pollution. *Principles and engineering*, Lens, P. N. L.; Hulshoff Pol, L., Eds. IWA Publishing, London, UK, 237-264.

- Leamon, J.H., Lee, W.L., Tartaro, K.R., Lanza, J.R., Sarkis, G.J., deWinter, A.D., Berka, J., Lohman, K.L., (2003). A massively parallel Pico Titer Plate™ based platform for discrete picoliter-scale polymerase chain reactions, *Electrophoresis*, 24, pp. 3769-3777.
- Lechevalier, M.P. (1977) Lipids in bacterial taxonomy -A taxonomist's view. *Critic Rev Microbiol* 5:109-210
- Lee, D.H., Zo, Y.G., Kim, S.J., (1996). Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism, *Appl. Environ. Microbiol.* 62, pp. 3112-3120.
- Lens, P.N.L., Omil, F., Lema, J.M., Hulshoff Pol, L.W. (2004) Biological treatment of organic sulfate-rich wastewaters. In: Environmental technologies to treat sulfur pollution. *Principles and engineering*, Lens, P. N. L.; Hulshoff Pol, L., Eds. IWA Publishing, London, UK, 153-174.
- Levene, M.J., Korch, J., Turner, S.W., Foquet, M., Craighead, H.G., Webb, W.W., (2003). Zero-Mode Waveguides for Single-Molecule Analysis at High Concentrations, *Science* 299, pp. 682-686.
- Liesack, L., Janssen, P.H., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., and Stackenbrandt, E. (1997) Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In *Modern soil microbiology*. van Elsas, J.D., Trevors, J.T., and Wellington, E.M.H. (eds). New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 375-439.
- Lin, J., Qian, J., (2007). Systems biology approach to integrative comparative genomics, *Expert Rev Proteomics* 4, pp. 107-119.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J., (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.* 63, pp. 4516-4522.
- Loy, A., Horn, M., Wagner, M., (2003). probeBase: an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes, *Nucleic Acids Research* 31, pp. 514-516.
- Lu, W.P., Kelly, D.P., (1988). Cellular Location and Partial Purification of the Thiosulphate-oxidizing Enzyme and Trithionate Hydrolyase from *Thiobacillus tepidarius*, *Journal of General Microbiology* 134, pp. 877-885.
- Ludvigsen, L., Albrechtsen, H.J., Holst, H., Christensen, T.H. (1997) Correlating phospholipid fatty acids (PLFA) in a landfill leachate polluted aquifer with biogeochemical factors by multivariate statistical methods. *FEMS Microbiol Rev* 20:447-460.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüssmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K.-H., (2004). ARB: a software environment for sequence data, *Nucleic Acids Research* 32, pp. 1363-1371.
- Luther III, G.W., Church, T.M., Powell, D., (1991). Sulfur speciation and sulfide oxidation in the water column of the Black Sea, Deep Sea Research Part A. *Oceanographic Research Papers* 38, p. S1121-S1137.
- Maestre, J.P., Rovira, R., Álvarez-Hornos, F.J., Fortuny, M., Lafuente, J., Gamisans, X., Gabriel, D. (2010) Bacterial community analysis of a gas-phase biotrickling filter for biogas mimics desulfurization through the rRNA approach. *Chemosphere* 80: 872-880
- Maestre, J.P., Rovira, R., Gamisans, X., Kinney, K.A., Kirisits, M.J., Lafuente, J., Gabriel, D., 2009. Characterization of the bacterial community in a biotrickling filter treating high loads of H₂S by molecular biology tools. *Water Sci. Technol.* 59 (7), 1331-1337.
- Marsh, T., (1999). Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products, *Current Opinion in Microbiology* 2, pp. 323-327.
- Masau, R.J.Y., Oh, J.K., Suzuki, I., (2001) Mechanism of oxidation of inorganic sulfur compounds by thiosulfate-grown *Thiobacillus thiooxidans*. *Can J Microbiol* 47:348-358

- Massol-Deya, A.A., Odelson, D.A., Hickey, R.F., Tiedje, J.M., (1995) Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). *Mol Microb Ecol Manual* 3.3.2: 1-18
- Melse, R.W., Kraakman, N.J.R., (1998) Biological treatment of waste gas containing H₂S and CS₂ combined with production of concentrated NaOH and H₂SO₄. *Med. Fac. Landbouww. Unive. Gent*, 63, (4B), 1841-1847.
- Metzker, M.L., (2009). Sequencing in real time, *Nat Biotech* 27, pp. 150-151.
- Middelburg, J.L., (2004) The geochemical sulfur cycle. In: Environmental technologies to treat sulfur pollution. *Principles and engineering*, Lens, P. N. L.; Hulshoff Pol, L., Eds. IWA Publishing, London, UK, 33-46.
- Moyer, C.L., Dobbs, F.C., Karl, D.M., (1994). Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii, *Appl. Environ. Microbiol.* 60, pp. 871-879.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.* 59, pp. 695-700.
- Muyzer, G., Smalla, K., (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Muyzer, G., (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems, *Current Opinion in Microbiology* 2, pp. 317-322.
- Müller, F.H., Bandejas, T.M., Urich, T., Teixeira, M., Gomes, C.M., Kletzin, A., (2004). Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase, *Molecular Microbiology* 53, pp. 1147-1160.
- Navin, N., Grubor, V., Hicks, J., Leib, E., Thomas, E., Troge, J., Riggs, M., Lundin, P., Månér, S., Sebat, J., Zetterberg, A., Wigler, M., (2006). PROBER: oligonucleotide FISH probe design software, *Bioinformatics* 22, pp. 2437-2438.
- Nocker, A., Burr, M., Camper, A., (2007). Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review, *Microbial Ecology* 54, pp. 276-289.
- Olasagasti, F., Lieberman, K.R., Benner, S., Cherf, G.M., Dahl, J.M., Deamer, D.W., Akeson, M., (2010). Replication of individual DNA molecules under electronic control using a protein nanopore, *Nat Nano* 5, pp. 798-806.
- Overmann, J., (2006). The Family Chlorobiaceae. *The Prokaryotes*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt (Eds.). Springer New York, pp. 359-378.
- Philip, L., Deshusses, M. A. (2003) Sulfur dioxide treatment from flue gases using a biotrickling filter-bioreactor system. *Environmental Science and Technology*, 37, 1978-1982.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB, *Nucleic Acids Research* 35, pp. 7188-7196.
- Pol, A., Op den Camp, H., J.M., Mees, S.G., Kersten, A.S., van der Drift, C., (1994) Isolation of a dimethylsulfide-utilising *Hyphomicrobium* species and its application in biofiltration of polluted air. *Biodegradation*, 5, (2), 105-112.
- Revah, S., Hinojosa, A., Morales, V., (1994) Air biodesulfurization in process plants. Presented at: Bioremediation: the Tokyo 1994 workshop. Organization for economic co-operation and development (OECD)
- Robertson, L., Kuenen, J., (2006). The Colorless Sulfur Bacteria. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt (Eds.). *The Prokaryotes*. pp. 985-1011.
- Roelfsema, J.H., Peters, D.J.M., (2005). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). In: J. M. Walker and R. Rapley (Eds.). *Medical Biometrics Handbook*. Humana Press, pp. 79-86.

- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., Nyrén, P., (1996). Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release, *Analytical Biochemistry* 242, pp. 84-89.
- Ronaghi, M., Uhlén, M., Nyrén, P., (1998). A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate, *Science* 281, pp. 363-365.
- Rother, D., Henrich, H.J., Quentmeier, A., Bardischewsky, F., Friedrich, C.G., (2001). Novel Genes of the sox Gene Cluster, Mutagenesis of the Flavoprotein SoxF, and Evidence for a General Sulfur-Oxidizing System in *Paracoccus pantotrophus* GB17, *J. Bacteriol.* 183, pp. 4499-4508.
- Sanger, F., Coulson, A.R., (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, *Journal of Molecular Biology* 94, pp. 441-448.
- Schieder, D., Quicker, P., Schneider, R., Winter, H., Prechtel, S., Faulstich, M. (2003) Microbiological removal of hydrogen sulfide from biogas by means of a separate biofilter system: experience with technical operation. *Water Science and Technology*, 48, (4), 209 - 212.
- Schippers, A., Sand, W., (1999). Bacterial Leaching of Metal Sulfides Proceeds by Two Indirect Mechanisms via Thiosulfate or via Polysulfides and Sulfur, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, pp. 319-321.
- Schmidt, M., (1984) Chemical problems of flue-gas desulfurization, in: Sulfur, its significance for chemistry, for the geo-, bio- and cosmosphere and technology (ed.: Müller, A. i Krebs, B.) *Elsevier*. pp.259-276
- Schwieger, F., Tebbe, C.C., (1998). A New Approach To Utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* 64, pp. 4870-4876.
- Sercu, B., Boon, N., Verstraete, W., Van Langenhove, H., (2006). H₂S degradation is reflected by both the activity and composition of the microbial community in a compost biofilter, *Applied Microbiology and Biotechnology* 72, pp. 1090-1098.
- Shendure, J., Porreca, G.J., Reppas, N.B., Lin, X., McCutcheon, J.P., Rosenbaum, A.M., Wang, M.D., Zhang, K., Mitra, R.D., Church, G.M., (2005). Accurate Multiplex Polony Sequencing of an Evolved Bacterial Genome, *Science* 309, pp. 1728-1732.
- Shiraishi, F., Zippel, B., Neu, T.R., Arp, G., (2008). In situ detection of bacteria in calcified biofilms using FISH and CARD-FISH, *Journal of Microbiological Methods* 75, pp. 103-108.
- Singh, O.V., Nagaraj, N.S., (2006). Transcriptomics, proteomics and interactomics: unique approaches to track the insights of bioremediation, *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* 4, pp. 355-362.
- Siyambalapitiya, N., Blackall, L.L., (2005). Discrepancies in the widely applied GAM42a fluorescence in situ hybridisation probe for Gammaproteobacteria, *FEMS Microbiology Letters* 242, pp. 367-373.
- Smet, E., Lens, P., Van Langenhove, H., (1998) Treatment of Waste Gases Contaminated with Odorous Sulfur Compounds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 28, (1), 89-117.
- Smit, E., Leeflang, P., Wernars, K., (1997) Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 23: 249-261.
- Stackebrandt, E., (2001). Phylogeny Based on 16SrRNA/DNA. *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Spolyar, L.W. (1951) Three men overcome by hydrogen sulfide in starch plant. *Industrial Health Monthly*, 11:116-117.
- Studel, R. (2004) The chemical sulfur cycle. In: *Environmental technologies to treat sulfur pollution. Principles and engineering*, Lens, P. N. L.; Hulshoff Pol, L., Eds. IWA Publishing, London, UK, 1-31.
- Sugarbaker, D.J., Richards, W.G., Gordon, G.J., Dong, L., De Rienzo, A., Maulik, G., Glickman, J.N., Chirieac, L.R., Hartman, M.L., Taillon, B.E., Du, L., Bouffard, P., Kingsmore, S.F., Miller, N.A.,

- Farmer, A.D., Jensen, R.V., Gullans, S.R., Bueno, R., (2008). Transcriptome sequencing of malignant pleural mesothelioma tumors, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, pp. 3521-3526.
- Suzuki, I., (1999). Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions, *Can. J. Microbiol.* 45, pp. 97-105.
- Talbot, G., Topp, E., Palin, M.F., Massé, D.I., (2008). Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors, *Water Research* 42, pp. 513-537.
- Teske, A., Nelson, D., (2006). The Genera *Beggiatoa* and *Thioploca*. *The Prokaryotes*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt (Eds.). Springer New York, pp. 784-810.
- Tomkinson, A.E., Vijayakumar, S., Pascal, J.M., Ellenberger, T., (2006). DNA Ligases: Structure, Reaction Mechanism, and Function, *Chemical Reviews* 106, pp. 687-699.
- Trapnell, C., Salzberg, S.L., (2009). How to map billions of short reads onto genomes, *Nat Biotech* 27, pp. 455-457.
- Urich, T., Coelho, R., Kletzin, A., Frazao, C., (2005). The sulfur oxygenase reductase from *Acidianus ambivalens* is an icosatetramer as shown by crystallization and Patterson analysis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1747, pp. 267-270.
- Vallaëys, T., Topp, E., Muyzer, G., Macheret, V., Laguerre, G., Rigaud, A., and Soulas, G. (1997) Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *Fems Microbiology Ecology* 24: 279-285.
- Van Groenestijn, J.W., Hesselink, P.G.M. (1993) Biotechniques for air pollution control. *Biodegradation*, 4, (4), 283-301.
- Vanhoorne, M., de Rouck, A., de Bacquer, D., (1995). Epidemiological study of eye irritation by hydrogen sulphide and/or carbon disulphide exposure in viscose rayon workers. *Annals of Occupational Hygiene* 39, pp. 307-315.
- Veiga, M.C., Fraga, M., Amor, L., Kennes, C. (1996). Tecnologías actuales para el tratamiento de aire contaminado con compuestos orgánicos volátiles: la biofiltración. *Retema* 9: 65-70
- Vila-Costa, M., Rinta-Kanto, J.M., Sun, S., Sharma, S., Poretsky, R., Moran, M.A., (2010). Transcriptomic analysis of a marine bacterial community enriched with dimethylsulfoniopropionate, *The ISME Journal* (2010) 4, 1410–1420
- Vishniac, W., (1952) The metabolism of *Thiobacillus thioparus*. I. The oxidation of thiosulfate. *J. Bacteriol.* 64, 363-373.
- Visser, J.M., de Jong, G.A.H., Robertson, L.A., Kuenen, J.G. (1996). Purification and characterization of a periplasmic thiosulfate dehydrogenase from the obligately autotrophic *Thiobacillus* sp. W5, *Archives of Microbiology* 166, pp. 372-378.
- Walsh, J.L., Ross, C.C., Smith, M.S., Harper, S.R., Wilkins, W.A. (1988) Handbook of biogas utilization. The Environment, Health, and Safety Division, Georgia Technological Research Institute, Atlanta, Georgia, USA.
- Waters, K.M., Pounds, J.G., Thrall, B.D., (2006). Data merging for integrated microarray and proteomic analysis, *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* 5, pp. 261-272.
- Weil, E.D., Sandler, S.R., Gernon, M., (2006) Sulfur compounds. In: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Wiley, 23, 1-84.
- Wisniewski-Dyé, F., Borziak, K., Khalsa-Moyers, G., Alexandre, G., Sukharnikov, L.O., Wuichet, K., Hurst, G.B., McDonald, W.H., Robertson, J.S., Barbe, V., Calteau, A., Rouy, Z., Mangenot, S., Prigent-Combaret, C., Normand, P., Boyer, M., Siguier, P., Dessaux, Y., Elmerich, C., Condemine, G., Krishnen, G., Kennedy, I., Paterson, A.H., González, V., Mavingui, P., Zhulin, I.B., (2011). Azospirillum Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments, *PLoS Genet* 7, p. e1002430.

- Woese,C.R., Fox,G.E., (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, pp. 5088-5090.
- Woese,C.R., Kandler,O., Wheelis,M.L., (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, pp. 4576-4579.
- Woodcock,K.E., Gottlieb,M. (2004) Natural gas. In: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Wiley, 12, 377-386.
- Yang,Y., Allen,E.R. (1994) Biofiltration control of hydrogen sulfide.1.Design and operational parameters. *Journal of Air and Waste Management*, 44, 863-868.
- Yu,E., Burba,A., Gerstein,M., (2007). PARE: A tool for comparing protein abundance and mRNA expression data, *BMC Bioinformatics* 8, p. 309.
- Zhang,W., Li,F., Nie,L., (2010). Integrating multiple omics analysis for microbial biology: application and methodologies, *Microbiology* 156, pp. 287-301.

CAPÍTOL 2. OPERACIÓ I MONITORATGE D'UN BIOFILTRE PERCOLADOR DE DESSULFURACIÓ D'ALTA CÀRREGA D'H₂S

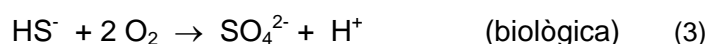
Una versió parcial d'aquest capítol ha estat enviada en forma de publicació científica al *Biochemical Engineering Journal* :

Rovira, R., Montebello, A.M., Diniz, T., Rago, L., Lafuente, J., Campoy, S., Gabriel, D. (2012) Experience with unstructured packing material in the desulphurization of high H₂S loaded biogas in a biotrickling filter. Operational aspects, pH transition and microbial evolution.

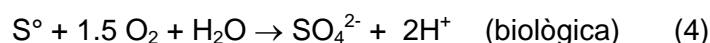
2.1 INTRODUCCIÓ

El sulfur d'hidrogen (H₂S) és un dels compostos reduïts de sofre més freqüents en les emissions gasoses d'una gran varietat d'indústries. Presenta un llindar de detecció olfatiu considerablement baix (0.001-0.3 ppm_v) i es caracteritza per ser un compost fàcil de reconèixer per la seva desagradable olor d'ous podrits. A més, presenta un alt grau de toxicitat biològica amb la perillositat afegida de que per a concentracions pròximes a 100 ppm_v la sensibilitat olfactiva queda disminuïda donant una falsa sensació de seguretat (Weil *et al.*, 2006). No obstant, el tema de les males olors no és la problemàtica principal dels processos industrials, com per exemple són la generació de biogàs en digestors anaerobis, on s'assoleixen concentracions de 500 ppm_v fins a 20.000 ppm_v d'H₂S (Woodcock i Gottlieb, 2004). En aquests casos l'eliminació de l'H₂S és imprescindible per evitar la corrosió dels motors i la generació de SO_x en els gasos de combustió. Per tant, l'eliminació de l'H₂S és necessària no únicament per qüestions de salut ambiental i seguretat sinó també per limitacions operatives.

Històricament, la tecnologia de tractament més freqüent utilitzada en l'eliminació de H₂S ha estat l'absorció selectiva en amines o altres compostos amb alta afinitat pel H₂S (Woodcock i Gottlieb, 2004). Tot i l'àmplia aplicació d'aquestes tecnologies, existeixen certs inconvenients a considerar com són els costos operacionals i energètics intrínsecs degut a la regeneració de la fase líquida absorbent. En aquest context, els processos biològics aplicats al tractament i control de la pol·lució de l'aire estan guanyant popularitat i esdevenint una tecnologia ideal per certes aplicacions (Deshusses, 1997; Devanny *et al.*, 1999; Kennes i Veiga, 2001). No obstant, a dia d'avui la seva aplicació no s'ha generalitzat en el tractament de gasos amb altes càrregues d'H₂S. La utilització biològica del H₂S com a font d'energia per part de microorganismes litoautòtrofs és un procés ben conegut que pot ser descrit amb les següents reaccions generals (Kuenen, 1975):



A més, en funció de les condicions redox de l'ambient i en presència de sofre elemental (S⁰) és possible un major grau d'oxidació fins a sulfat tot i la limitació per sulfur (Kuenen, 1975):



Els biofiltres, bioentadors i biofiltres percoladors han demostrat ser una alternativa adequada, ecològica i rendible per al tractament de gasos contaminats, especialment per al tractament de baixes concentracions d'H₂S (Yang i Allen, 1994; Deviny *et al.*, 1999; Gabriel i Deshusses, 2003a; Janssen *et al.*, 2004; Kim i Deshusses, 2005). En canvi, per a altes concentracions d'H₂S (> 1000 ppm_v) l'aplicació de bioentadors, biofiltres i biofiltres percoladors és limitada. Són pocs els processos industrials que s'han desenvolupat i comercialitzat àmpliament en aquest sentit. De la mateixa manera, les investigacions reportades per a altes càrregues d'H₂S són escasses. Tot i així, la necessitat de desenvolupar processos alternatius i sostenibles impulsen i justifiquen la recerca al voltant d'aquestes tecnologies.

Centrant l'estudi al voltant dels biofiltres percoladors, treballs com el de Fortuny *et al.* (2008) demostren l'èxit operacional d'un biofiltre percolador, d'escala laboratori, tractant altes càrregues de H₂S (2.000 ppm_v). No obstant, les complexes relacions entre la disponibilitat d'oxigen, el pH i els processos de sulfur-oxidació requereixen una major experimentació amb l'objectiu de millorar el disseny del sistema. Aspectes com la posada en marxa, el temps de residència del gas en llit buit (EBRT), l'efecte de la velocitat de percolació (TLV), el pH d'operació i la relació O₂/H₂S han estat bastament estudiats (Montebello *et al.*, 2010; Fortuny *et al.*, 2011).

Tot i la viabilitat tècnica del bioprocés, manquen molts altres aspectes per estudiar i optimitzar, com per exemple la part biòtica del procés, que ha estat considerada històricament des d'un punt de vista macroscòpic com una "caixa negra" de composició i activitat desconeguda. En aquest sentit els capítols 3, 4 i 5 d'aquesta tesi enfoquen l'estudi des de la part microbiològica del procés.

Per altre banda, l'ampli ventall de possibilitats en la configuració operacional d'un biofiltre percolador permet una àmplia varietat de conformacions en funció de l'aplicació objectiu. Per això, l'optimització del disseny passa per experimentar i estudiar noves configuracions i nous règims d'operació, com per exemple la utilització de diferents materials de rebliment. Materials estructurats com els experimentats amb anterioritat (Fortuny *et al.*, 2011) i materials desordenats com les roques de lava, l'escuma de poliuretà, els anells de ceràmica porosa o els anells Pall són exemples de materials usats en biofiltres percoladors (Kim i Deshusses, 2008).

A partir del coneixement acumulat, el present treball pretén ser una continuació dels estudis desenvolupats amb altes càrregues de H₂S. Enfocant l'estudi en la posada en marxa i monitoratge del biofiltre amb la implementació dels anells Pall com a material de rebliment.

2.2 ANTECEDENTS

El grup de recerca GENOCOV de la Universitat Autònoma de Barcelona, i concretament el Dr. Marc Fortuny, va dissenyar, construir i operar un bioreactor pilot a escala de laboratori basat en un biofiltre percolador convencional configurat amb un compartiment auxiliar pel subministrament d'oxigen. Una descripció detallada de la configuració del mateix es pot trobar a Fortuny *et al.* (2008). El biofiltre percolador va estar operant ininterrompudament durant més d'un any en condicions d'alta càrrega de H₂S amb un material de rebliment ordenat, període en que es van realitzar diversos estudis sobre el procés. Principalment, les experimentacions realitzades van estar enfocades a investigar la posada en marxa del procés, aspectes de disseny com la capacitat d'eliminació màxima (EC_{max}), el temps de residència en llit buit (EBRT); i aspectes operacionals com l'efecte de la velocitat de percolació i les òptimes condicions d'oxigen per a la dessulfuració d'altres càrregues d'H₂S (Fortuny *et al.*, 2011), entre d'altres. El gran coneixement acumulat al voltant de l'operació del biofiltre percolador tractant altes càrregues d'H₂S, es va complementar paral·lelament amb estudis d'identificació dels microorganismes que es desenvolupen en el procés mitjançant tècniques de biologia molecular (Maestre *et al.*, 2009; 2010). Aquests estudis conformen els antecedents del present treball i van conduir a la definició de nous objectius i estudis al voltant de la biologia del procés de biofiltració d'H₂S.

2.3 OBJECTIUS

Amb intenció d'aprofundir en el coneixement del procés es va plantejar la modificació del material de rebliment del biofiltre substituint el llit ordenat empaquetat amb discs HD-QPAC® per un rebliment desordenat empaquetat amb anelles Pall de 10 mm de diàmetre. La intenció d'aquesta nova configuració també persegueix facilitar els reiterats mostreigs de biomassa per a estudis futurs, minimitzant l'alteració de l'operació, a més de permetre nous estudis a partir de la nova configuració operacional. La substitució del material de rebliment implica un règim d'operació diferent a l'experimentat en treballs precedents. En aquest sentit, els objectius d'aquest capítol van dirigir-se a la posada en marxa i operació del biofiltre amb la nova configuració tractant altes càrregues de H₂S. De manera que la modificació i optimització de paràmetres operacionals van esdevenir propòsits d'aquest treball.

2.3 MATERIALS I MÈTODES

2.4.1 MUNTATGE EXPERIMENTAL

El bioreactor experimental utilitzat en aquest treball és una modificació del biofiltre percolador d'escala de laboratori dissenyat pel Dr. Fortuny en estudis anteriors. Els nous objectius definits al voltant de l'estudi de les comunitats microbianes presents al biofiltre van conduir a la modificació del cos del biofiltre per tal de facilitar i permetre el mostreig de biomassa d'una manera ràpida, minimitzant l'impacte en l'operació del bioreactor i en la biomassa (fig. 2.1).

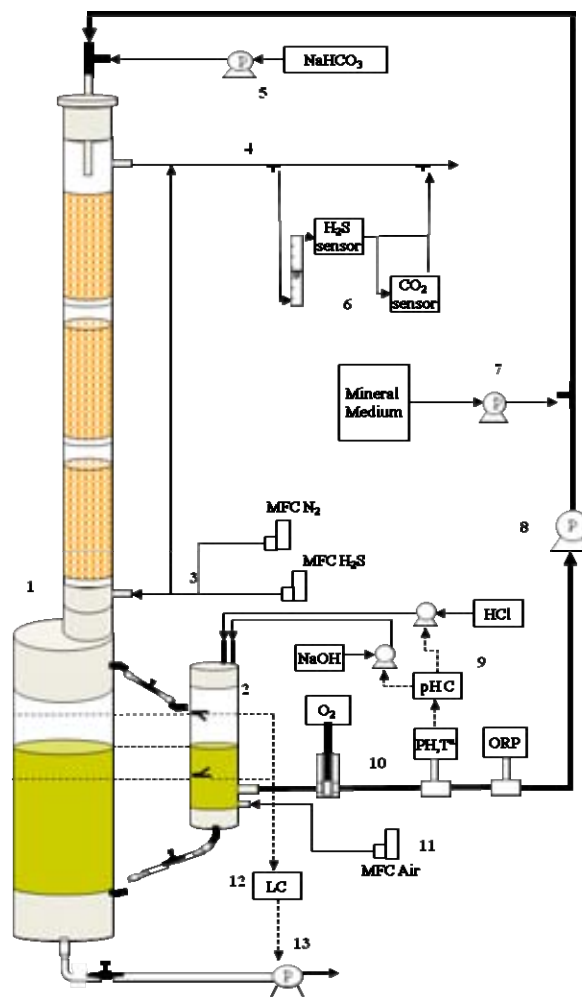


Figura 2.1 Esquema del muntatge experimental 1: Cos del reactor principal; 2: Reactor subministrador d'O₂; 3: Entrada Gas; 4: Sortida Gas; 5: Subministre HCO₃⁻; 6: Monitoratge de Gasos; 7: Subministre Medi Mineral; 8: Bomba de Recirculació; 9: Control de pH; 10: Monitoratge del Líquid; 11: Subministre d'Aire; 12: Control de nivell; 13: Purga del Líquid purge.

Comparativament amb la configuració anterior es va canviar el material de rebliment utilitzat i es va seccionar el cos del bioreactor a tres alçades. El material de rebliment utilitzat en els estudis previs consistia en un llit ordenat empaquet amb HD-QPAC®

(Lantec Products Inc., CA, USA) de 4 x 4 mm de pas de garbell que va ser substituït per un llit desordenat format per anelles Pall d'acer inoxidable de 10 mm diàmetre (fig. 2.2). L'experiència acumulada en altres sistemes amb aquest tipus de suport (Rovira *et al.*, 2008) i la freqüent implementació de les anelles Pall en processos industrials va fer d'aquest material de rebliment una bona configuració per al biofiltre percolador amb intenció de facilitar-ne els mostreigs de biomassa.

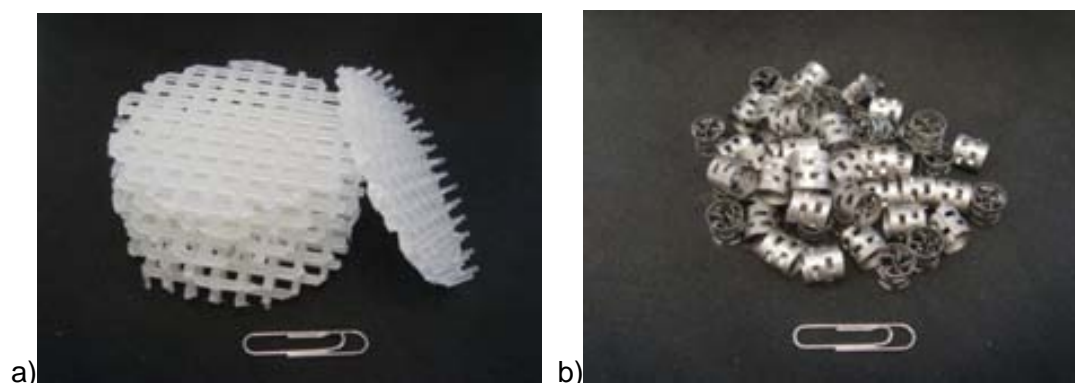


Figura 2.2. Materials de rebliment usats en el muntatge experimental. a) Discs de plàstic amb un pas de garbell de 16 mm², disposats de manera ordenada conformaven l'empacament del llit del biofiltre. b) Anelles d'acer inoxidable tipus Pall de 10 mm de diàmetre van ser utilitzades en la nova configuració.

El diàmetre intern del reactor era 0.071 m, amb una alçada de llit de 0.53 m, resultant amb 2.15 L de volum de reactor. Aquestes modificacions van permetre mostrejar biomassa del cos empaquetat del biofiltre a diferents alçades sense alterar pràcticament l'operació del bioprocés. El biofiltre percolador amb el nou material de rebliment es va posar en marxa i va estar operant contínuament durant més d'un any. Inicialment amb una configuració dels paràmetres similars als de l'operació prèvia al canvi del material de rebliment. Aquest fet però, va comportar la modificació de diversos paràmetres operacionals, que posteriorment es presenten, amb intenció d'optimitzar aspectes relacionats amb la transferència de matèria i la producció de sofre elemental amb el nou material de rebliment.

Els cabals d'entrada de gas al biofiltre consistien en H₂S, N₂ i aire, es subministraven usant controladors digitals de flux màssic (Bronkhorst, Holanda). Respecte la fase líquida, el medi mineral (MM) contenia (g L⁻¹): NH₄Cl, 1; KH₂PO₄, 0.12; K₂HPO₄, 0.15; CaCl₂, 0.02; MgSO₄·7H₂O, 0.2, a més de 1 ml L⁻¹ de la recepta (Pfenning *et al.*, 1981) solució d'elements traça: HCl, 6.76 ml L⁻¹; FeCl₂·4H₂O, 1.5 mg L⁻¹; H₃BO₃, 0.06 mg L⁻¹; MnCl₂·4H₂O, 0.1 mg L⁻¹; CoCl₂·6H₂O, 0.12 mg L⁻¹; ZnCl₂, 0.07 mg L⁻¹; NiCl₂·6H₂O, 0.025 mg L⁻¹; CuCl₂·2H₂O, 0.015 mg L⁻¹; NaMoO₄·2H₂O, 0.025 mg L⁻¹; EDTA·Na₂O₈·2H₂O, 4.28 mg L⁻¹; H₂O ultrapura fins a 5 L i pH ajustat a 4.2 amb NaOH. Paral·lelament, es subministrava en excés una font de carboni inorgànic en forma de NaHCO₃ (1.44 g C d⁻¹).

La fase líquida és renovada contínuament durant l'operació mitjançant la sincronització automatitzada del subministrament de MM, bicarbonat i líquid de purga, utilitzant 3 bombes peristàltiques (figura 2.1). El control del nivell de líquid va estar regulat per l'actuació de la bomba de purga o per la regulació del cabal d'entrada de MM. El pH era regulat per l'addició de HCl o NaOH 1 M mitjançant l'actuació de dues bombes peristàltiques. El control de pH consistia en un control ON/OFF amb un rang definit entre pH 6-6.5 i una freqüència d'actuació i durada de 60 i 2 segons respectivament.

2.4.2 MÈTODES ANALÍTICS

Es van monitorar contínuament diferents paràmetres del biofiltre, entre ells, la concentració de sortida d'H₂S del biofiltre usant un sensor electroquímic de H₂S calibrat fins a 300 ppm_v, amb una precisió de ± 1.5 ppm_v i un temps de resposta $t_{90} < 10$ s (Sure-cell, Euro-Gas Management Services LTD, UK). Per tal de mesurar concentracions més altes d'H₂S, s'utilitza un controlador de flux màssic (Bronkhorst) per diluir amb aire de xarxa el cabal de sortida del reactor. Durant la posada en marxa es va configurar un factor de dilució 1:20, fet que augmentava la concentració mínima mesurable d'H₂S a 30 ppm_v ($1.5 \text{ ppm}_v \times 20 = 30 \text{ ppm}_v$). Posteriorment es va reduir a 1:5 augmentant la precisió de mesura d'H₂S a la sortida fins a 10 ppm_v.

A la fase líquida es va monitorar el pH, el potencial d'oxidació-reducció (ORP) (PH28, Crison Instruments) a més de la mesura de l'oxigen dissolt (DO) (Oxi340i, WTW). Complementant aquests mesures, durant els quatre primers dies de la posada en marxa es va instal·lar un sistema analític en línia de TDS (Total Dissolved Sulphide: $\text{H}_2\text{S}_{(\text{aq})} + \text{HS}^- + \text{S}^{2-}$) amb una configuració tipus FIA (Flow Injection Analysis). El mètode desenvolupat per Andrea M. Montebello *et al.* (2010) va ser implementat amb un límit de detecció de $1.5 \times 10^{-5} \pm 0.9 \times 10^{-5} \text{ M S}^{-2}$ ($0.48 \pm 0.29 \text{ mg L}^{-1}$). Paral·lelament, durant la primera etapa de posada en marxa de la planta, es van prendre mostres diàriament de la fase líquida per a l'anàlisi del carboni inorgànic (TIC) usant l'analitzador TOC 1020 (IO Analytical), i de les espècies iòniques de sofre d'interès (sulfat i tiosulfat) amb el cromatògraf iònic ICS-1000 amb una columna IonPac AS9-HC (Dionex Corporation).

Posteriorment al període considerat de posada en marxa de la planta, la periodicitat de les mesures de la fase líquida van normalitzar-se a 2 mostreigs setmanals.

2.4.3 INOCULACIÓ I POSADA EN MARXA

La inoculació del bioreactor es va dur a terme amb fangs aerobis de la planta de tractament d'aigües residuals municipals de Manresa. Els fangs van ser diluïts 1:1 amb MM, assolint una concentració de sòlids en suspensió volàtils (SSV) de 2.4 g·L⁻¹ en el col·lector del biofiltre. El inòcul va ser recirculat contínuament a través del material de rebliment del biofiltre durant 24 h sense alimentació de gas ni renovació de fase líquida. Posteriorment, en la posada en marxa de la planta i durant un període de 20 hores, la concentració entrant d'H₂S es va fixar a 1500 ppm_v (càrrega de 38.31 g H₂S m⁻³ h⁻¹) juntament amb una cabal d'aeració de 150 ml min⁻¹. El control de pH va mantenir la posada en marxa entre 6 i 6.5, per evitar limitacions de falta de carboni es va subministrar carboni inorgànic en excés (0.71 ± 0.08 g C-HCO₃⁻ g⁻¹ S-H₂S). Durant la posada en marxa del biofiltre es va establir un temps de residència en llit buit (EBRT) de 180 s., un temps mig de retenció hidràulic del líquid (HRT) de 78 ± 8 h i una velocitat de percolació del líquid (TLV) de 3.8 m h⁻¹ (255 ml min⁻¹). Després de les primeres 20 hores d'operació, la concentració de H₂S entrant es va establir a 2000 ppm_v (càrrega de 55.6 g H₂S m⁻³ h⁻¹) com a configuració definitiva en l'operació del biofiltre.

Posteriorment al període de posada en marxa amb les anelles Pall, el biofiltre percolador va estar operant de manera ininterrompuda durant pràcticament un any. Inicialment la configuració dels paràmetres d'operació es van mantenir respecte als de l'operació prèvia al canvi del material de rebliment (Fortuny *et al.*, 2008). Tal i com es detalla en l'apartat 2.5.1 de resultats, aquest fet va conduir a modificar diversos paràmetres operacionals amb intenció d'optimitzar el règim d'operació del biofiltre minimitzant la producció de sofre elemental amb el nou material de rebliment.

2.4.4 TESTS EXPERIMENTALS

El bioreactor va estar operant contínuament durant 350 dies amb la nova configuració d'anells Pall. Amb l'objectiu posterior d'estudiar la microbiota del procés es va decidir conduir l'operació del biofiltre cap a l'oxidació completa fins a sulfat (veure eqs. 2, 3 i 4), per tal de minimitzar la producció de sofre elemental. En aquest sentit i al llarg del període considerat, es van implementar diverses actuacions simultàniament sobre paràmetres operacionals. Una de les actuacions va consistir en la disminució del HRT en diverses etapes de l'operació (taula 2.1) per tal d'afavorir la renovació de la fase líquida percolant, minimitzant així la concentració de les espècies en la fase líquida i, per tant, la possible inhibició per productes de la degradació de l'H₂S.

Taula 2.1 Configuració del HRT del biofiltre percolador tractant altes càrregues d'H₂S durant el període d'operació.

Dies d'operació	HRT (hores)
0-15	70-86
15-63	45-60
63-131	18-21
131-224	33-34
224-350	23-26

La modificació del cabal de recirculació va ser una altra actuació implementada (taula 2.2) amb la intenció de modificar la velocitat de percolació de la fase líquida i d'aquesta manera augmentar la càrrega d'oxigen subministrada al biofiltre.

Taula 2.2 Configuració del TLV del biofiltre percolador tractant altes càrregues d'H₂S durant el període d'operació.

Dies d'operació	TLV (m·h ⁻¹)
0-60	4.0
60-111	11.69
111-342	6.0
342-350	4.0

Com a darrera actuació amb intenció de millorar l'aportació d'oxigen al sistema, es va modificar la relació O₂/H₂S (taula 2.3).

Taula 2.3 Configuració del cabal d'aire entrant i de la relació O₂/H₂S del biofiltre percolador tractant altes càrregues de H₂S durant el període d'operació.

Dies d'operació	O ₂ /H ₂ S (v v ⁻¹)	Cabal aire IN (ml min ⁻¹)
0-4	23.60	150.00
4-12	29.50	187.50
12-25	49.17	312.50
25-38	29.50	187.50
38-216	49.17	312.50
216-333	59.01	375.00
333-350	49.17	312.50

A partir de les diferents configuracions de TLV i dels cabals d'aire entrants configurats es van considerar diferents etapes d'operació en funció de la càrrega d'oxigen resultant aportada al sistema. Partint d'una configuració inicial definida pel coneixement i experiència acumulada en operacions prèvies (Fortuny *et al.*, 2008) i en base als efectes de les càrregues d'oxigen experimentats es va definir la configuració definitiva d'operació del biofiltre amb el nou material de rebliment.

2.5 RESULTATS I DISCUSSIÓ

2.5.1 INOCULACIÓ, POSADA EN MARXA

La posada en marxa del biofiltre es va dur a terme en base a l'experiència acumulada en operacions prèvies del bioreactor (Fortuny *et al.*, 2011). No obstant, la diferent conformació del material de rebliment utilitzat en aquest estudi va resultar en un comportament diferent del biofiltre, fàcilment apreciable des dels primers dies d'operació. Les primeres 20 hores d'operació posteriors a la inoculació del biofiltre van ser configurades amb una concentració d'entrada de 1500 ppm_v d'H₂S. Considerant l'evolució del biofiltre durant el període estimat de posada en marxa (fig.2.3a), es va observar que immediatament després de la posada en marxa es van detectar quantitats significatives d'H₂S a la sortida de la fase gas, demostrant una baixa capacitat d'absorció per part del sistema, inclús treballant a un pH constant controlat entre 6.0 i 6.5. Durant el primer dia d'operació l'eficàcia d'eliminació (RE) va assolir valors inferiors al 20% però que ràpidament, al cap de 50 hores des de la posada en marxa van millorar fins a valors superiors al 90% de RE. Inversament a l'evolució del RE, la concentració d'H₂S a la sortida de la fase gas va disminuir en poc més de 2 dies, fins a valors no detectables amb el sensor electroquímic d'H₂S. Tot semblava indicar una ràpida posada en marxa del sistema, no obstant, inesperadament el dia 3, la concentració de H₂S a la sortida de la fase gas va augmentar progressivament fins a 400 ppm_v de H₂S. Indicant un període de posada en marxa i d'adaptació més llarg que en altres operacions (Fortuny *et al.*, 2008). Les fluctuacions del RE i l'elevada inestabilitat del sistema durant els primers dies d'operació resulten habituals en sistemes d'aquest tipus (Gabriel i Deshusses, 2003b) essencialment com a conseqüència de la manca d'una població estable de microorganismes en el bioreactor. Tot i la davallada del RE durant aquest període, el biofiltre va evolucionar ràpidament fins el dia 6 assolint valors superiors al 95% de RE i consolidant l'operació des del punt de vista de tractament del contaminant d'interès.

Les oscil·lacions de pH especialment accentuades durant els primers dies d'operació, degut a l'actuació del sistema de control de pH, es van minimitzar clarament a partir del sisè dia d'operació (fig. 2.3b). Aquest aprimament de les oscil·lacions de pH són un clar indicatiu de la tendència del bioreactor a acidificar el medi degut a la predominant activitat biològica en l'operació (Montebello *et al.*, 2010). Aquest fet va conduir l'operació del sistema a pH 6, sota el control configurat d'addició de base per mantenir el pH en condicions de neutralitat.

Degut a problemes operacionals, el seguiment de l'ORP no es va poder monitorar fins el dia 12 d'operació. No obstant, des de l'inici de la posada en marxa es va realitzar el seguiment de forma contínua i en línia del TDS, fet que va permetre determinar una lleugera acumulació de sulfur a la fase líquida durant els 2 primers dies, assolint valors pròxims al llindar de detecció al cap de 40 hores de la posada en marxa del sistema. A partir del segon dia d'operació les lectures de TDS van indicar la no presència de sulfur a la fase líquida. Posteriorment a partir del dia 12 d'operació, els valors obtinguts de ORP oscil·laven entre -90 mV i 100 mV, essent potencials fàcilment relacionables amb situacions de producció de sulfat i de no acumulació de sulfur a la fase líquida (Fortuny *et al.*, 2011).

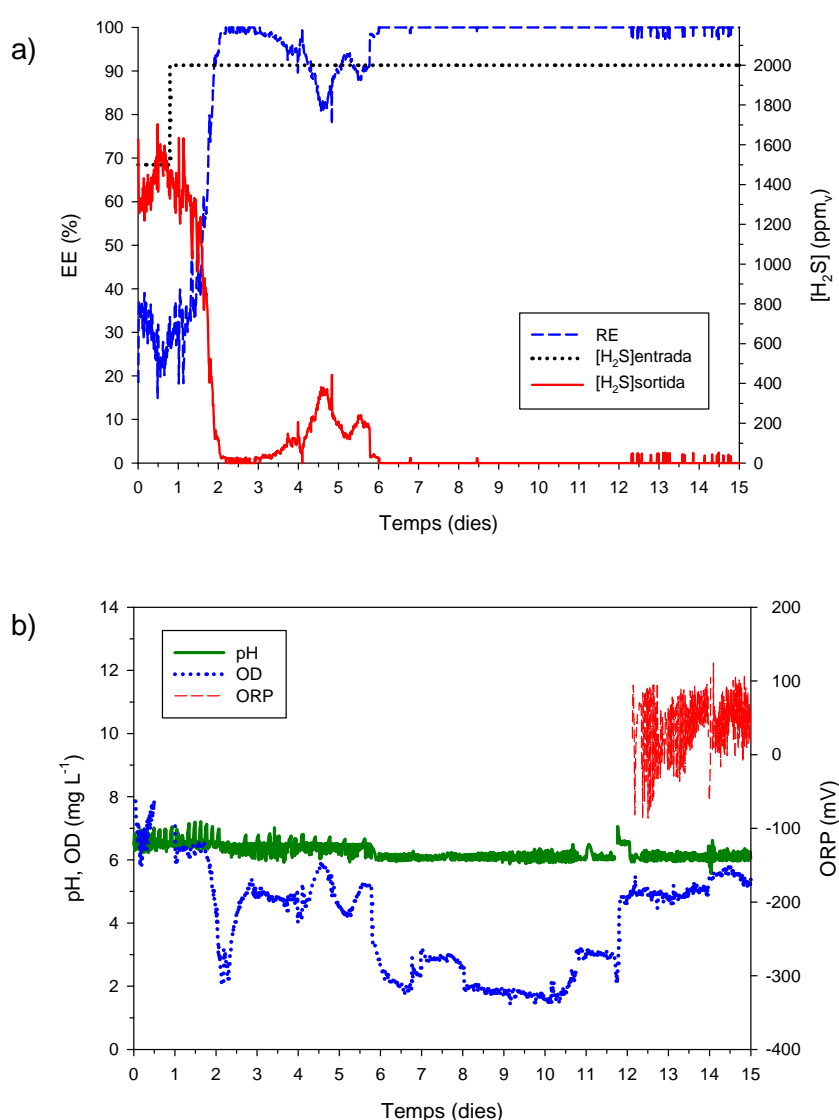


Figura 2.3 Seguiment en línia del biofiltre percolador durant els 15 primers dies d'operació. a) eficàcia d'eliminació (RE) i les concentracions d'entrada i sortida de H₂S i b) pH, potencial d'oxidació-reducció (ORP) i oxigen dissolt (OD).

És important comentar que, a partir del dia 4 d'operació, es va monitorar l'OD (resultats no mostrats) en la línia de sortida del reactor 1 (fig. 2.1), representant les mesures d'OD de la fase líquida posteriors a la percolació a través del cos del biofiltre. Els valors d'OD obtinguts, amb valors molt pròxims al zero analític, indicaven la possible ocurrència de zones anòxiques en la zona inferior del bioreactor. En conseqüència, es va actuar augmentant els cabals d'aire entrants, resultant en un augment de la ràtio O₂/H₂S (taula 2.3). Tot i l'augment d'aportació d'aire al sistema a partir del dia 4 (29.50 O₂/H₂S v·v⁻¹), no es van observar augments notables en els valors d'OD obtinguts a la fase líquida. De manera oposada, al cap de 48 hores del canvi implementat i coincidint amb el dia 6 d'operació en que s'assoleix la màxima RE des de la posada en marxa, l'OD va experimentar un notable descens adjudicable a la incipient activitat biològica sulfur-oxidant (fig. 2.3).

Des d'un punt de vista hidrodinàmic, la posada en marxa del biofiltre es va realitzar sota una mateixa configuració. La velocitat de percolació de la fase líquida es va fixar a 4 m·h⁻¹, essent una TLV estàndard en aquest tipus de bioprocessos. Per altre banda, l'HRT del sistema es va mantenir al voltant de 78 ± 8 h, al llarg dels 15 primers dies d'operació. Tot i ser una configuració amb una baixa freqüència de renovació de la fase líquida, no es van observar problemes d'acumulació de sulfur ni d'espècies iòniques en concentracions inhibidores. Ambdues configuracions van mostrar-se adequades per a la posada en marxa del biofiltre amb anells Pall com a material de rebliment.

No obstant, durant els primers dies d'operació es va observar una important producció de S⁰ fàcilment apreciable a la zona baixa del cos del biofiltre. Amb el propòsit de minimitzar la producció de sofre elemental i conduir l'operació fins a l'oxidació a SO₄²⁻, el dia 12 d'operació es va augmentar notablement l'entrada d'aire al sistema (59.01 O₂/H₂S v·v⁻¹). Paral·lelament, el dia 15 es va modificar l'HRT a 50 ± 3 h amb intenció de reduir el temps de resposta del sistema front als canvis de les condicions d'operació.

Posteriorment als 15 primers dies d'operació, considerats com el període de posada en marxa del sistema, es va prioritzar conduir la dessulfuració a condicions de no generació de S⁰. Es van realitzar un seguit d'actuacions basades en la modificació de la càrrega d'oxigen aportada al sistema amb l'objectiu de conduir el biofiltre a un nou règim d'operació amb el mínim S⁰ possible. Les motivacions dels estudis posteriors focalitzant la part microbiològica del procés justificaven aquest escenari d'operació, ja que la presència de grans quantitats de S⁰ en la biomassa qüestionava l'aplicabilitat de les tècniques de biologia molecular plantejades.

2.5.2 EFECTE DE LA CÀRREGA D'OXIGEN EN L'OPERACIÓ DEL BIOFILTRE

Malgrat assolir una RE d'H₂S superior al 95% en menys d'una setmana, es va observar una notable acumulació de S⁰ al cos del biofiltre. Aquest fet va conduir a diferents actuacions enfocades a optimitzar l'aportació d'oxigen per a la nova configuració. Sota l'objectiu de minimitzar la producció de S⁰, maximitzant al mateix temps la producció de SO₄²⁻, es va valorar l'efecte de diferents càrregues d'oxigen. Les variables modificades van ser la velocitat de percolació de la fase líquida i el cabal d'aire entrant al biofiltre. El seguit de canvis operacionals desenvolupats es poden observar en la figura 2.4 juntament amb el balanç de matèria estimat per a les espècies sulfuroses procedents de l'oxidació del H₂S. Tal i com s'ha demostrat en treballs anteriors (Jansen *et al.*, 1999), el balanç de matèria es realitza assumint que tot l'H₂S eliminat es converteix en sulfat i sofre elemental, sent aquest darrer calculat per diferència entre els dos primers.

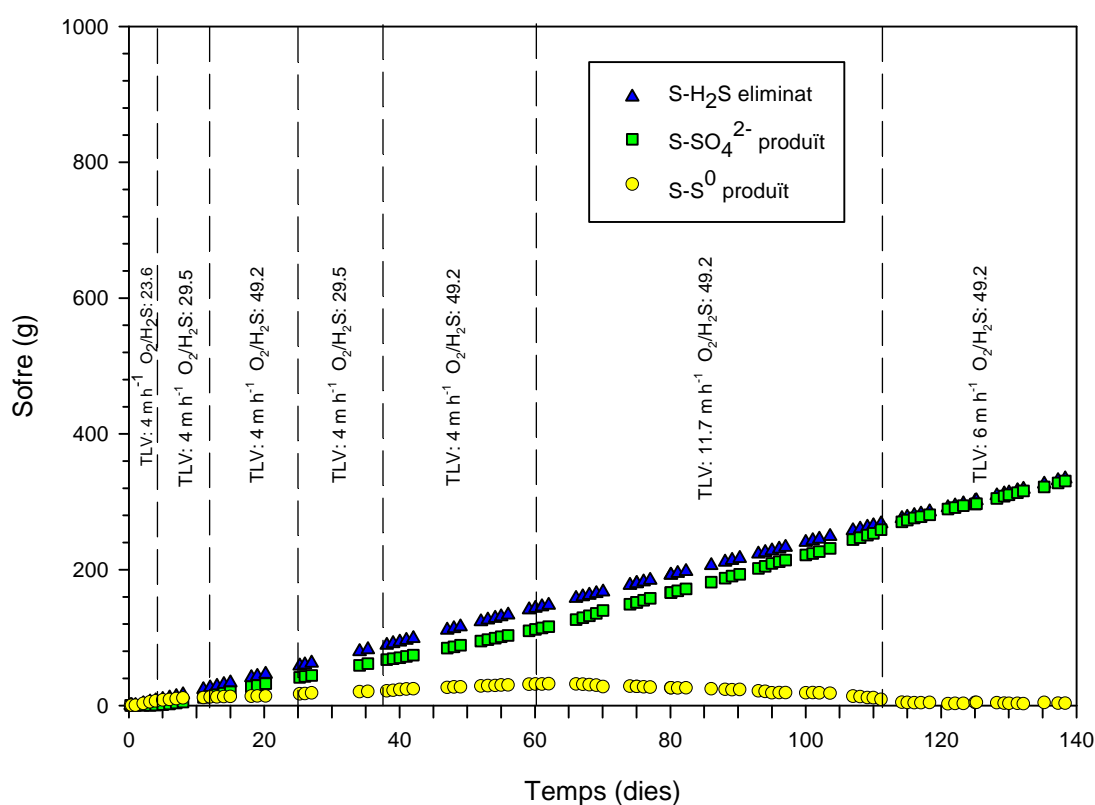


Figura 2.4 Balanç de sofre acumulat en l'operació del biofiltre. Valors calculats en base les mesures de sulfat produït i a l'H₂S eliminat. El període considerat engloba des de la posada en maxa fins al punt d'operació de màxima producció de sulfat minimitzant la generació de sofre elemental.

Al llarg dels primers 60 dies d'operació es va mantenir una mateixa TLV de 4 m h⁻¹. Contràriament, en el mateix període es van realitzar diferents canvis del cabal d'aire entrant que es van traduir en diferents ràtios O₂/H₂S. Al quart dia d'operació es va augmentar un 25% el cabal d'aire entrant per tal de minimitzar la gran producció de sofre al bioreactor, però no va ser fins al dia 12 d'operació en que es va augmentar el cabal d'aire a 312.5 ml min⁻¹ (49.17 O₂/H₂S v v⁻¹) que es va aturar la producció de S^o. Posteriorment i durant un període de dos setmanes es va reduir el cabal d'aire entrant (187.5 ml min⁻¹ ; 29.5 O₂/H₂S v v⁻¹) amb la intenció de comprovar la resposta del biofiltre i descartar possibles causes associades a fenòmens d'adaptació i posada en marxa. Tot i la reducció de la ràtio O₂/H₂S en aquesta etapa, el biofiltre no va mostrar un augment significatiu en la quantitat de S^o produït, confirmant la configuració al voltant del llindar d'operació sense producció de S^o. No obstant això, es van aportar majors càrregues d'oxigen per tal de conduir l'operació a condicions mínimes de S^o. Per això, el dia 38, es va augmentar de nou el cabal d'aire entrant a 312.5 ml min⁻¹ (49.17 O₂/H₂S v v⁻¹), i el dia 60 es va augmentar notablement la velocitat de percolació de la fase líquida (TLV = 11.7 m·h⁻¹) per tal d'augmentar la penetració d'oxigen al llarg del cos del biofiltre. Aquestes dues actuacions van resultar en dues càrregues d'oxigen progressives que es van traduir en una disminució del sofre elemental acumulat, maximitzant per tant l'oxidació completa fins a SO₄²⁻ (veure fig. 2.4). A partir del dia 65 es va mostrar clarament un canvi de comportament del biofiltre, no tant sols augmentant la relació de SO₄²⁻ produït per H₂S eliminat, sinó també mostrant una disminució del S^o produït acumulat al cos del biofiltre, probablement degut a l'activitat de certs bacteris oxidadors de sofre elemental com són algunes espècies de *Thiobacillus* (Suzuki *et al.*, 1992; Kelly *et al.*, 1997).

D'aquesta manera, aproximadament al cap de 115 dies des de la inoculació, el biofiltre havia minimitzat el S^o acumulat al cos del bioreactor i operava majoritàriament produint SO₄²⁻. Arribats a aquest punt es va decidir disminuir la TLV a 6 m·h⁻¹ per tal d'assimilar-la a valors típics en aquests tipus de biofiltres. Els diferents canvis de configuració en la TLV i el cabal d'aire entrant efectuats al llarg dels 140 primers dies d'operació van permetre consolidar una operació estable amb les característiques buscades a partir de la configuració operacional definida.

Segons la càrrega d'oxigen aportada al biofiltre es poden distingir diferents etapes d'operació al llarg d'aquest període d'experimentació. En aquest sentit, la taula 2.4 recull les diferents càrregues d'oxigen aportades, definides com el producte de TLV per la concentració d'OD en el cabal de recirculació, el qual és directament funció de les ràtios O₂/H₂S implementades. La figura 2.5 mostra l'efecte de les càrregues

d'oxigen estudiades sobre el comportament del biofiltre en termes de producció de sulfat. No es van considerar els valors corresponents als 6 primers dies d'operació degut a la possible afectació de la posada en marxa del biofiltre. Tampoc van ser considerades les càrregues d'oxigen experimentades posteriorment als 140 dies d'operació, doncs equivalien a càrregues superiors innecessàries per descriure el comportament del biofiltre en termes de producció de SO₄²⁻.

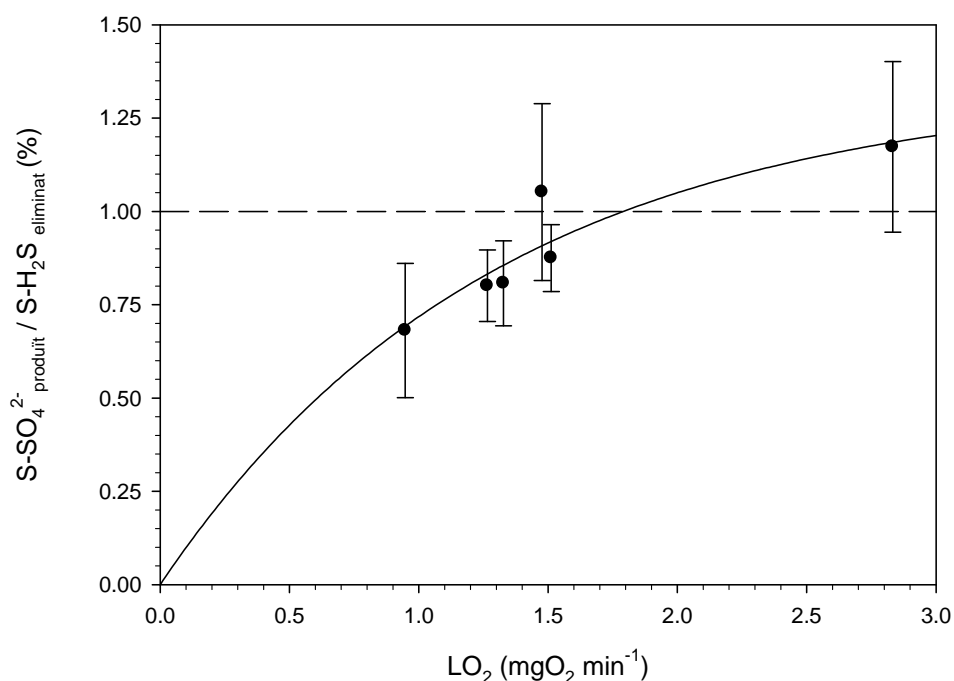


Figura 2.5 Relacions experimentals entre la càrrega d'oxigen (LO₂) aportada al sistema i el rendiment de SO₄²⁻ produït per H₂S eliminat. Amb línia discontinua es marca el 100% del rendiment de producció de SO₄²⁻. Amb línia contínua es descriu la tendència aproximada de la relació LO₂ vs SO₄²⁻ produït / H₂S eliminat.

A partir dels rendiments de producció de SO₄²⁻ en funció de les càrregues d'oxigen aportades es va poder acotar l'operació òptima del biofiltre amb els anells Pall com a material del reblliment. Segons la relació definida experimentalment es va observar que la càrrega d'oxigen adequada per conduir l'operació a valors màxims de SO₄²⁻ estava al voltant de 1.7 mg O₂ min⁻¹. Per sota d'aquesta càrrega d'oxigen, tot i mantenir-se la RE > 98%, solament una part del H₂S és oxidat completament fins a SO₄²⁻, resultant amb una producció de S⁰ (fig. 2.4). En canvi, durant el període operacional del dia 60 al 111 es va experimentar un excés de càrrega d'oxigen amb un cabal mig de 2.83 mg O₂ min⁻¹, situació que va ocasionar excepcionalment un rendiment de SO₄²⁻ produït superior al 100%.

Taula 2.4 Càrregues d'oxigen practicades segons la TLV i la relació entrant O₂/H₂S definides en les diferents etapes d'operació. Es mostren els rendiments de SO₄²⁻ produïts per a cada període.

Dies d'operació	LO ₂ mitjana (mg min ⁻¹)	LO ₂ Desviació	TLV (m h ⁻¹)	O ₂ /H ₂ S (v v ⁻¹)	SO ₄ ²⁻ /H ₂ S (%)	SO ₄ ²⁻ /H ₂ S Desviació
6 al 12	0.95	0.28	6.0	29.5	68.11	17.99
12 al 25	1.51	0.31	6.0	49.2	87.52	8.95
25 al 38	1.33	0.18	4.0	29.5	80.76	11.40
38 al 60	1.27	0.13	4.0	49.2	80.08	9.59
60 al 111	2.83	0.49	11.7	49.2	117.31	22.86
111 al 140	1.48	0.85	6.0	49.2	105.19	23.70

El sentit d'aquest rendiment teòric és associable al fet que l'excés de càrrega d'oxigen va permetre oxidar part del S⁰ acumulat al cos del biofiltre durant les etapes operades amb menys càrrega d'oxigen. Aquest fet resulta interessant com a possible estratègia d'operació en bioreactors industrials per minimitzar l'acumulació de sofre elemental en el biofiltre sense necessitat d'aturar el reactor per haver de netejar el material de rebliment.

Així doncs, l'experimentació al voltant de paràmetres d'operació com la velocitat de percolació de la fase líquida i el cabal d'aire entrant al biofiltre va permetre estudiar i definir la millor configuració d'operació del biofiltre d'estudi sota l'objectiu de minimitzar el S⁰ present al bioreactor.

2.5.3 OPERACIÓ ESTACIONÀRIA I MOSTREIGS DE BIOMASSA

Un cop optimitzades les condicions d'operació, el biofiltre va estar operant contínuament durant 350 dies en condicions estacionàries a excepció de d'alteracions puntuals degut a les preses de mostres i les actuacions de manteniment de sondes. Tal i com es pot observar al gràfic de la figura 2.6, el seguiment de les variables OD, ORP i pH al llarg dels 350 dies mostren una operació estable del biofiltre malgrat les oscil·lacions periòdiques pròpies de l'operació, demostrant que el biofiltre és un sistema robust i fàcilment adaptable a lleugers canvis d'operació.

És interessant destacar l'accident operacional del dia 209 causat per la interrupció de l'aportació d'aire al sistema, el qual va estar operant durant 60 hores sense subministrament d'aire, alimentant 2.000 ppm_v de H₂S. Es va passar d'una producció de SO₄²⁻ del 98 % del dia 207, a una producció del 55 % de SO₄²⁻ el dia 211, i es van assolir valors de ORP de -400 mV indicatiu d'una possible acumulació de sulfur a la fase líquida. Tot i així, el biofiltre va recuperar ràpidament la seva activitat i els seus valors estacionaris d'operació en poc més de 20 dies reconfigurant una alimentació creixent d'H₂S.

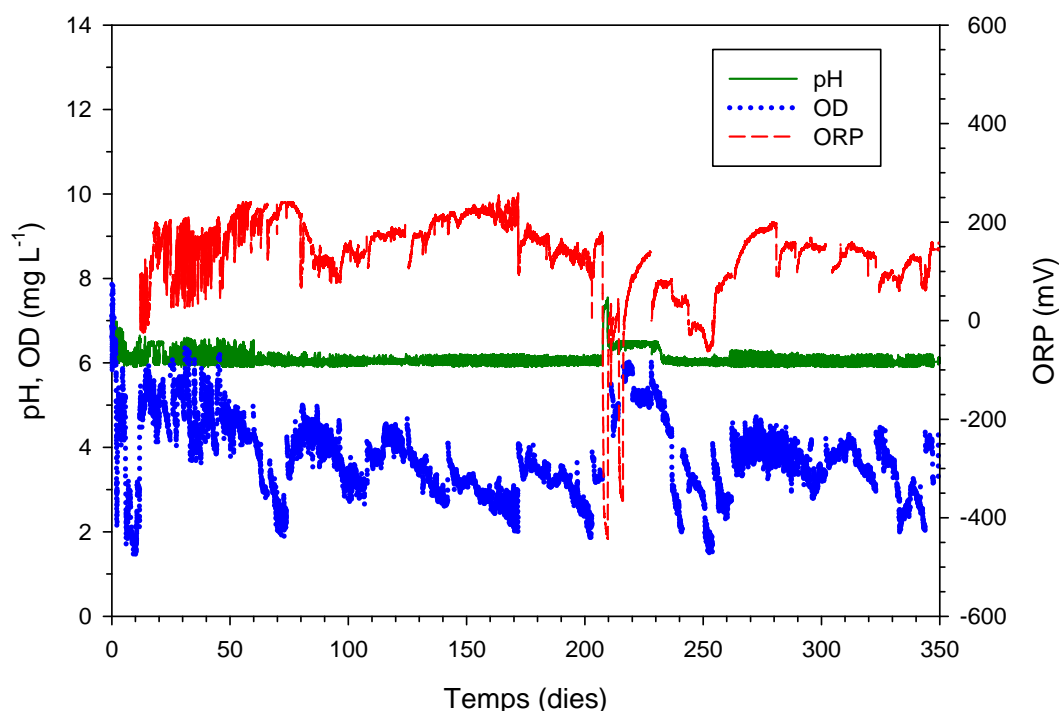


Figura 2.6 Seguiment del biofiltre percolador al llarg dels 350 dies d'operació considerats. pH, potencial d'oxidació-reducció (ORP) i oxigen dissolt (OD).

Al llarg del període operacional es van realitzar diferents mostreigs de biomassa amb l'objectiu de realitzar-ne diferents estudis. Per una banda, es va plantejar l'estudi de les comunitats microbianes mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ* per fluorescència (FISH) i, per altra banda, es va plantejar un estudi metatranscriptòmic de les comunitats que es desenvolupen en el bioreactor.

Taula 2.5 Recull de variables operacionals, concentracions iòniques i rendiments de dessulfuració per a cada un dels mostreigs realitzats al llarg del període d'operació.

Configuració	Mostreig FISH	Mostreig FISH	Mostreig FISH	Mostreig Metatranscriptòmica
Dia d'operació	26	84	245	350
pH	6.13	6.04	6.02	6.05
OD (mg L⁻¹)	5.48	4.67	2.29	3.04
ORP (mV)	71.57	160.33	-37.36	156.36
TLV (m h⁻¹)	4.00	11.69	6.00	4.00
HRT (h)	55	18	25	27
SO₄²⁻ (mg L⁻¹)	754.94	359.09	559.83	517.43
S₂O₃²⁻ (mg L⁻¹)	0.05	0.00	0.00	0.00
O₂/H₂S (v v⁻¹)	29.50	49.17	49.17	49.17
SO₄²⁻/H₂S	74 %	100 %	100 %	100 %
S⁰/H₂S	26 %	0 %	0 %	0 %

Per a cada un dels mostreigs realitzats (veure taula 2.5), es van recopilar diferents dades de l'operació amb intenció de descriure les condicions ambientals del bioreactor referides als moments de presa de mostres. D'aquesta manera, la

descripció de l'operació busca complementar les anàlisis microbiològiques plantejades i així poder relacionar el coneixement acumulat al voltant de l'operació amb els estudis de la part microbiològica del procés.

2.6 CONCLUSIONS

S'ha modificat la configuració d'un biofiltre percolador a escala laboratori tractant altes càrregues d'H₂S. El cos del biofiltre va ser substituït per un llit desordenat empaquetat amb anells Pall de 10 mm de diàmetre. El seguiment de les variables operacionals monitorades han confirmat com a satisfactòria l'estratègia d'inoculació i posada en marxa del sistema. La inoculació del biofiltre amb fangs aerobis d'una planta de tractament d'aigües residuals ha permès una ràpida posada en marxa del biofiltre assolint, al cap de sis dies i de manera estable, RE superiors al 98% amb una càrrega d'entrada de 55.6 g H₂S m⁻³ h⁻¹.

Els resultats d'operació del biofiltre amb les anells Pall mostren que la configuració establerta inicialment segons la conformació prèvia del biofiltre, resulta inadequada per a l'operació amb l'actual configuració. El nou material de rebliment implementat ha causat un règim d'operació diferent del bioreactor degut al diferent comportament dels anells Pall, en aspectes de transferència de matèria i d'hidrodinàmica durant l'operació. Aquest fet va conduir l'operació del bioreactor a l'acumulació de S⁰ al cos del biofiltre, un fet no desitjable en operacions de llarga durada ni en estudis de la microbiologia del procés. Així doncs, els anells Pall resulten ser un material de rebliment efectiu per a la dessulfuració d'altas càrregues de H₂S, tot i que requereix una notable aportació d'oxigen al sistema (1.7 mg O₂ min⁻¹) per tal de dur a terme una dessulfuració completa fins a SO₄²⁻.

Els resultats de les experimentacions desenvolupades mostren la versatilitat i l'adaptació del biofiltre a les configuracions canviants sense que es vegi afectada la seva capacitat d'eliminació.

La operació del biofiltre a diferents ràtios O₂/H₂S, així com a diferents velocitats de percolació de la fase líquida ha permès definir la relació existent per aquesta configuració entre la càrrega d'oxigen aportada al sistema i el rendiment d'eliminació de H₂S en forma de SO₄²⁻.

2.7 REFERÈNCIES

- Deshusses, M. A., (1997) Biological waste air treatment in biofilters. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 335-339.
- Devinny, J. S., Deshusses, M. A., Webster, T. S. (1999) *Biofiltration for Air Pollution Control*. CRC-Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA.
- Fortuny, M., Baeza, J.A., Gamisans, X., Casas, C., Lafuente, J., Deshusses, M.A., Gabriel, D., (2008). Biological sweetening of energy gases mimics in biotrickling filters, *Chemosphere* 71, pp. 10-17.
- Fortuny, M., Gamisans, X., Deshusses, M.A., Lafuente, J., Casas, C., Gabriel, D., (2011). Operational aspects of the desulfurization process of energy gases mimics in biotrickling filters, *Water Research* 45, pp. 5665-5674.
- Gabriel, D., Deshusses, M.A., (2003a). Retrofitting existing chemical scrubbers to biotrickling filters for H₂S emission control, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, pp. 6308-6312. Notes: 10.1073/pnas.0731894100
- Gabriel, D., Deshusses, M.A., (2003b). Performance of a full-scale biotrickling filter treating H₂S at a gas contact time of 1.6 to 2.2 seconds, *Environ. Prog.* 22, pp. 111-118.
- Janssen, A. J. H.; Lettinga, G.; de Keizer, A. (1999) Removal of hydrogen sulphide from wastewater and waste gases by biological conversion to elemental sulphur. Colloidal and interfacial aspects of biologically produced sulphur particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 151, 389 -397.
- Janssen AJH, Dijkman H and Janssen G, (2004). Novel biological processes for the removal of H₂S and SO₂ from gas streams, in *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution. Principles and Engineering*, ed. by Lens PNL and Hulshoff PL. IWA Publishing, London, pp. 265-280
- Kelly, D.P., Shergill, J.K., Lu, W.P., Wood, A.P., (1997). Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek* 71, pp. 95-107.
- Kennes, C., Veiga, M. C., (2001) *Bioreactors for Waste Gas Treatment*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Kim, S., Deshusses, M.A., (2005). Understanding the limits of H₂S degrading biotrickling filters using a differential biotrickling filter, *Chemical Engineering Journal* 113, pp. 119-126.
- Kim, S., Deshusses, M.A., (2008). Determination of mass transfer coefficients for packing materials used in biofilters and biotrickling filters for air pollution control. 1. Experimental results, *Chemical Engineering Science* 63, pp. 841-855.
- Kuenen, J.G., (1975). Colourless sulfur bacteria and their role in the sulfur cycle, *Plant and Soil* 43, pp. 49-76.
- Maestre, J.P., Rovira, R., Gamisans, X., Kinney, K.A., Kirisits, M.J., Lafuente, J., Gabriel, D. (2009) Characterization of the bacterial community in a biotrickling filter treating high loads of H₂S by molecular biology tools. *Water Sci. Technol.* 59 (7), 1331-1337.
- Maestre, J.P., Rovira, R., Álvarez-Hornos, F.J., Fortuny, M., Lafuente, J., Gamisans, X., Gabriel, D., (2010) Bacterial community analysis of a gas-phase biotrickling filter for biogas mimics desulfurization through the rRNA approach, *Chemosphere* 80, pp. 872-880.
- Montebello, A.M., Baeza, M., Lafuente, J., Gabriel, D., (2010). Monitoring and performance of a desulphurizing biotrickling filter with an integrated continuous gas/liquid flow analyser, *Chemical Engineering Journal* 165, pp. 500-507.
- Pfenning, N., Widdel, F., Trüper, H. G. (1981) The dissimilatory sulfate-reducing bacteria. In: *The Prokaryotes*, Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, A., Schlegel, H. G., Springer Verlag, NY, USA, (1), 926-940.

- Rovira, R., Maestre, J.P., Gamsans, X., Lafuente, J., Mas, J., Gabriel, D. (2008) Use of molecular biology techniques to compare the bacterial community diversity of a lab-scale biofilter and an industrial biofilter treating high loads of H₂S. *Proceedings 10th International Chemical and Biochemical Engineering Conference (CHEMPOR 2008)*
- Suzuki, I., Chan, C.W., Takeuchi, T.L., (1992). Oxidation of Elemental Sulfur to Sulfite by *Thiobacillus thiooxidans* Cells, *Appl Environ Microbiol* 58, pp. 3767-3769.
- Weil, E. D.; Sandler, S. R.; Gernon, M., (2006) Sulfur compounds. In: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Wiley, 23, 1-84.
- Woodcock, K. E., Gottlieb, M. (2004) Natural gas. In: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Wiley, 12, 377-386.
- Yang, Y., Allen, E. R. (1994) Biofiltration control of hydrogen sulfide.1. Design and operational parameters. *Journal of Air and Waste Management*, 44, 863-868.

CAPÍTOL 3. ESTUDI DE LES COMUNITATS MICROBIANES DEL BIOFILTRE PERCOLADOR DE DESSULFURACIÓ D'ALTA CÀRREGA DE H₂S, MITJANÇANT TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR.

El treball d'aquest capítol ha estat publicat parcialment en les següents publicacions científiques:
Maestre, J.P., Rovira, R., Gamisans, X., Kinney, K.A., Kirisits, M.J., Lafuente, J., Gabriel, D. (2009) "Characterization of the bacterial community in a biotrickling filter treating high loads of H₂S by molecular biology tools". *Water Science & Technology* 59.7:1331-1337

Maestre, J:P., Rovira, R., Álvarez-Hornos, F.J., Fortuny, M., Lafuente, J., Gamisans, X., Gabriel, D. (2010) "Bacterial community analysis of a gas-phase biotrickling filter for biogas mimics desulfurization through the rRNA approach". *Chemosphere* 80: 872-880

Voldria agrair la col·laboració de la Patrizia Bianchi, Laura Rago i Tercia Bezerra en el desenvolupament d'aquest treball.

3.1 INTRODUCCIÓ

Els sistemes de tractament biològic han demostrat ser una alternativa eficient, ecològica i rendible per al tractament de gasos contaminats i especialment per a la dessulfuració de gasos (Devinny *et al* 1999; Kennes i Veiga, 2001; Gabriel i Deshusses, 2003). El gran coneixement acumulat al voltant del disseny i l'operació d'aquests bioprocessos ha augmentat significativament durant els últims anys, reforçant la seva viabilitat tècnica i ampliant les possibles configuracions d'operació. No obstant, la històrica perspectiva d'estudi d'aquests bioprocessos des d'un punt de vista operacional, ha fet que la part biòtica d'aquests sistemes hagi estat considerada regularment des d'un punt de vista macroscòpic de composició i activitat desconeguda.

Focalitzant l'estudi en els biofiltres percoladors, existeixen una gran quantitat de treballs al voltant de la dessulfuració d'H₂S (Kim i Deshusses, 2005; Montebello *et al.*, 2010; Fortuny *et al.*, 2011), majoritàriament centrats en aspectes operacionals. El coneixement deficient de l'estructura i la dinàmica de poblacions de les comunitats microbianes d'aquests sistemes, així com la pobre comprensió del rol fisiològic de les poblacions clau, resulta, a la pràctica, en operacions suboptimitzades i per tant susceptibles d'estudi i millora. Cal tenir en consideració que les poblacions microbianes involucrades en els processos de sulfur-oxidació, són els catalitzadors biològics reals d'aquests sistemes i l'estabilitat i èxit del procés dependrà, en part, de l'abundància i la supervivència d'aquestes espècies. L'abundància relativa i la diversitat d'espècies microbianes que es desenvolupen en un bioreactor tractant altes càrregues de H₂S, es veu influenciada per un ampli ventall de factors, com per exemple: les característiques de l'inòcul, la composició del gas alimentat i la concentració de contaminant, les condicions ambientals (pH, temperatura, O₂ disponible, salinitat, etc), i d'altres paràmetres configuracionals propis de l'operació (com el material de rebliment, l'EBRT, el HRT, la TLV, etc). Per tant, considerar la part microbiològica d'aquests sistemes com una caixa negra operativa és una simplificació imprecisa de la realitat que limita el coneixement i optimització del propi bioprocés. Per això, és de notable importància l'estudi i caracterització de les poblacions bacterianes que coexisteixen i es desenvolupen en els biofiltres per tal d'entendre els processos biològics que succeeixen en ell durant la degradació del H₂S.

Històricament, els estudis de caracterització de les comunitats bacterianes realitzats en sistemes de tractament biològic es basaven en tècniques tradicionals de cultiu diferencial i anàlisi descriptiu dels cultius aïllats (Wagner *et al.*, 1993; Malhautier *et*

al., 2003; Sheridan *et al.*, 2003). Les grans limitacions d'aquests mètodes d'identificació basats en tècniques de cultiu, van impulsar la necessitat de desenvolupar altres tècniques que milloressin l'estudi de la composició i dinàmica de poblacions de les comunitats microbianes complexes (Head *et al.*, 1998). En aquest sentit, diversos autors han realitzat estudis d'identificació i caracterització microbiana en biofiltres convencionals i biofiltres percoladors mitjançant diferents aproximacions (Talbot *et al.*, 2008). Entre elles, l'anàlisi de biomarcadors com els àcids grassos dels fosfolípids de membrana (PLFA) han estat utilitzats per a l'estudi de la composició microbiana (Keitz *et al.*, 1999). De la mateixa manera, l'anàlisi de marcadors filogenètics, com són els gens de rRNA, s'ha generalitzat com una de les estratègies més esteses i aplicades en la identificació de comunitats microbianes d'aquests bioprocessos. Algunes de les tècniques de biologia molecular aplicades en aquest sentit són la hibridació *in situ* per fluorescència (FISH) (Moller *et al.*, 1996), l'electroforesi en gel amb gradient desnaturalitzant (DGGE) (Sercu *et al.*, 2006; Borin *et al.*, 2006), el polimorfisme de longitud del fragment de restricció terminal (TRFLP) (Gregory *et al.*, 2010) i el clonatge i seqüenciació dels gens rRNA (Friedrich *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2003), entre d'altres.

Els microorganismes amb capacitat sulfur-oxidant conformen un grup amb una àmplia diversitat filogenètica, que s'estén des d'espècies del domini *Archaea* com són les *Sulfolobales*, fins a una gran varietat d'espècies del domini *Bacteria* (Friedrich *et al.*, 2005; Robertson i Kuenen, 2006), com poden ser diverses classes de *Proteobacteris*, o diverses famílies del *phylum Chlorobi* (bacteris verds del sofre). Aquesta gran diversitat filogenètica es tradueix en la presència d'un ampli ventall de metabolismes relacionats amb la sulfur-oxidació, causada per la divergència evolutiva que a permès la adquisició de la capacitat sulfur-oxidant per a cada grup filogenètic (Friedrich *et al.*, 2001). A més a més, la gran varietat de compostos reduïts de sofre susceptibles de ser usats com a donadors d'electrons (H₂S, S⁰, S₂O₃²⁻, SO₃²⁻), i els diferents acceptors possibles, com l'oxigen o el nitrat (Robertson i Kuenen, 2006) han permès que la capacitat sulfur-oxidant esdevingui part de mecanismes tant diversos com la fototròfia, la litotròfia i la quimiotròfia. L'hàbitat natural d'aquests microorganismes sulfur-oxidants és ben variat, poden trobar-se en naixements d'aigua, grutes sulfuroses, profunditats oceàniques, zones volcàniques, claveguerams, plantes de tractament d'aigües residuals i un llarg etcètera condicionat per la presència d'algun dels donadors i dels acceptors d'electrons anteriorment mencionats (Schlegel i Jannasch, 2006). Tot i l'enorme distribució d'hàbitats possibles i la gran diversitat metabòlica dels microorganismes sulfur-oxidants, existeixen pocs treballs relacionats amb les comunitats microbianes sulfur-oxidants

en els hàbitats naturals on es troben (Casamayor *et al.*, 2000; Van der Wielen *et al.*, 2005; Sorokin *et al.* 2006). Igualment, el coneixement existent al voltant de les poblacions microbianes que es desenvolupen en un bioreactor de dessulfuració d'alta càrrega d'H₂S és encara molt més escàs.

Durant els últims anys el clonatge i seqüenciació de marcadors filogenètics ha estat una eina bàsica per a la descripció de la composició de comunitats microbianes complexes de sistemes naturals on s'han identificat diferents grups de microorganismes sulfur-oxidants (Engel *et al.*, 2004; Sattley i Madigan, 2006). D'aquesta manera s'ha pogut estudiar la diversitat de bacteris involucrats en processos de sulfur-oxidació sota una gran varietat de condicions ambientals, com per exemple front a la presència de gradients d'oxigen en el sí del reactor (Maestre *et al.*, 2010). Així doncs, els biofilms d'ambients sulfurosos representen una bon nínxol ecològic, útil com a model d'estudi de la diversitat de condicions ambientals d'aquests hàbitats (Elshahed *et al.*, 2003). A partir del clonatge i seqüenciació dels gens 16S rRNA dels biofilms d'aquests ambients, s'han identificat diversos microorganismes amb capacitat sulfur-oxidant com per exemple, espècies de *Thiothrix*, *Sulfurimonas denitrificans*, *Pseudomonas putida* i *Thiobacillus denitrificans*, entre d'altres (Macalady *et al.*, 2006). Els grups de proteobacteris èpsilon i gamma apareixen com a grups bacterians amb especial importància en aquests ambients sulfurosos (Engel *et al.*, 2004). A més, s'ha observat la capacitat de certs grups filogenètics d'acumular sofre tant a nivell intracel·lular com de forma extracel·lular formant filaments de sofre (Taylor *et al.*, 1999). La gran diversitat metabòlica existent, fa que certes espècies i grups de microorganismes predominin en certs ambients en funció de les condicions ambientals. En aquest sentit, s'ha observat com espècies de *Thiothrix* mostren una notable predominança en ambients sulfurosos amb rangs de concentració d'oxigen de 0.3-2 mg·L⁻¹ (Nielsen *et al.*, 2000), probablement degut al seu metabolisme mixòtrof tot i no ser considerat un microorganisme anaeròbic.

Una altre tècnica que ha estat àmpliament utilitzada en l'estudi de comunitats microbianes és la tècnica FISH. Aquesta és una tècnica citogenètica que es basa en la detecció d'una seqüència específica de DNA permetent la identificació i quantificació de microorganismes concrets o de grups filogenètics directament en la mostra ambiental, sense dependre de les tècniques de cultiu tradicionals (Amann *et al.*, 2001). Les sondes fluorescents més extensament utilitzades per a l'estudi de comunitats microbianes d'ambients naturals amb aquesta tècnica han estat dissenyades en base a la variabilitat de la seqüència de 16S rRNA (Ravenschlag *et al.*, 1999; Bosshard *et al.*, 2000; Kobabe *et al.*, 2004). De la mateixa manera, la gran versatilitat de la tècnica FISH, supeditada a la disponibilitat de sondes, ha permès la

seva aplicació en l'estudi de comunitats de diversos bioprocessos (Wagner *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 2008; Jubany *et al.* 2009;). La diversitat filogenètica existent entre les espècies amb capacitat sulfur-oxidant, ha fet impossible el disseny d'una sonda específica única pels gens 16S rRNA que englobi tots els microorganismes amb aquesta capacitat metabòlica. Conseqüentment, els treballs enfocats a estudiar aquestes comunitats, com el descrit per Okabe *et al.* (2007), es basen necessàriament en el disseny i utilització de sondes específiques de gèneres o espècies concretes. En aquest estudi i usant la tècnica de FISH es van definir les espècies sulfur-oxidants predominants que es desenvolupen en els biofilms dels claveguerams, entre les quals es van identificar, entre d'altres, diverses espècies de *Thiothirx*, *Thiobacillus plumbophilus*, *Thiomonas intermedia*, *Halothiobacillus neapolitanus*, *Acidithiobacillus thiooxidans* i *Acidiphilum acidophilum*. Així doncs, en base a la disponibilitat de sondes específiques per a les espècies d'interès, es planteja la possibilitat de realitzar un estudi al volant de les poblacions sulfur-oxidants que es desenvolupen en el biofiltre que centra aquesta tesi.

3.2 OBJECTIUS

Complementant el coneixement acumulat al voltant de l'operació del biofiltre percolador es planifica un estudi d'identificació i seguiment de les comunitats microbianes que es desenvolupen en el bioreactor de dessulfuració d'alta càrrega de H₂S mitjançant tècniques de biologia molecular. Es planteja la construcció de dues llibreries de clons per als gens de 16S rRNA a partir de la biomassa desenvolupada en el biofiltre. En base a l'anàlisi filogenètic de la informació de seqüència obtinguda de les dues llibreries de clons, es pretén identificar la diversitat filogenètica de les mostres i la complexitat de les comunitats microbianes referides a dos moments d'operació.

A partir de la identificació realitzada en base el clonatge i seqüenciació dels gens de 16S rRNA, es planteja el seguiment d'algunes de les espècies identificades amb capacitat sulfur-oxidant, mitjançant la tècnica FISH. Segons la identificació i quantificació de les espècies analitzades en els diferents mostreigs i zones del biofiltre és pretén estudiar la dinàmica de poblacions així com l'adaptació diferencial del grups de microorganismes estudiats al llarg de l'operació. D'aquesta manera, la intenció general del treball persegueix caracteritzar els processos biològics de la dessulfuració d'H₂S focalitzant l'estudi en la identificació i evolució de les poblacions microbianes.

3.3 MATERIALS I MÈTODES

3.3.1 LLIBRERIES DE CLONS DELS GENS 16S RRNA

Com a primera aproximació en l'estudi de les comunitats microbianes presents en un biofiltre percolador eliminant altes càrregues de H₂S es van construir dues llibreries de clons basades en el marcador filogenètic 16S rRNA. A partir de dos mostreigs integrats, separats en el temps i representatius de diferents zones del biofiltre percolador, es va estudiar la diversitat microbiana de l'operació així com l'evolució de les comunitats al llarg del temps.

Mitjançant la seqüenciació i anàlisi dels fragments de 16S rRNA clonats, es va caracteritzar la composició filogenètica de les comunitats microbianes presents en el biofiltre percolador per a cada mostreig realitzat.

3.3.1.1 MUNTATGE EXPERIMENTAL

El biofiltre percolador experimental a partir del qual es van desenvolupar les llibreries de clons va ser dissenyat i construït pel Dr. Marc Fortuny com a integrant del grup de recerca en gasos GENOCOV de la Universitat Autònoma de Barcelona. El bioreactor es va basar en un biofiltre percolador convencional a escala de laboratori, configurat amb un compartiment auxiliar pel subministrament d'oxigen. El material de rebliment utilitzat consistia en un llit ordenat empaquetat amb discs HD-QPAC® (Lantec Products Inc.). Una descripció detallada de la configuració del biofiltre es pot trobar en el treball de Fortuny *et al.* (2008). El biofiltre va estar operant contínuament durant un període de 9 mesos configurat amb un EBRT de 180 s, un HRT de 51 ± 6 h i una TLV de 3.8 m h⁻¹ (255 ml min⁻¹). La concentració de gas a l'entrada va ser definida a 2000 ppm_v de H₂S (55.6 g H₂S m⁻³h⁻¹). Les quantitats de H₂S, N₂ i aire es van subministrar usant controladors digitals de flux màssic (Bronkhorst).

El medi mineral (MM) contenia 1 g L⁻¹ NH₄Cl; 0.12 g L⁻¹ KH₂PO₄; 0.15 g L⁻¹ K₂HPO₄; 0.02 g L⁻¹ CaCl₂; 0.2 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, a més de 1 ml L⁻¹ de la solució d'elements traça (Pfenning *et al.*, 1981). Paral·lelament s'alimentava contínuament NaHCO₃ (1.44 g C d⁻¹) com a font de carboni inorgànic.

La fase líquida va estar contínuament renovada durant l'operació mitjançant la sincronització automatitzada del subministrament de MM, bicarbonat i el líquid de purga, utilitzant 3 bombes peristàltiques (fig. 2.1) El control del nivell de líquid va estar regulat per la actuació de la bomba de purga o per la regulació del cabal d'entrada de MM. El pH era regulat per l'addició de HCl o NaOH 1 M. El control de pH consistia en

un control ON/OFF amb un rang d'actuació definit entre pH 6.0 i 6.5 amb una freqüència d'actuació i durada de 60 s i 2 s respectivament.

3.3.1.2 MOSTREIGS DE BIOMASSA

El biofiltre percolador va estar operant contínuament durant 9 mesos sota les condicions anteriorment esmentades. La biomassa utilitzada per a la construcció de les llibreries de clons va ser mostrejada en dues ocasions amb intenció de generar dos llibreries de clons comparables. En ambdós mostreigs es va extreure biomassa de tres altures del cos del biofiltre. El primer mostreig es va realitzar al cap de 42 dies de la posada en marxa del sistema i el segon mostreig es va realitzar el dia 189 d'operació, posterior a la inoculació del biofiltre. El biofilm desenvolupat sobre el material de reblliment era fàcilment apreciable a totes les altures del cos del bioreactor. Després de la interrupció de l'operació es van extreure diferents discs del material de reblliment, HD-QPAC® (Lantec Products Inc., CA, USA) de 4 x 4 mm de pas de garbell. La biomassa va ser mesclada 1:1 en volum, de les diferents altures del material de reblliment per tal d'obtenir una mostra integrada i representativa del biofiltre percolador. Cada mostreig va ser processat independentment, resultant en una llibreria de clons per a cada mostra obtinguda.

3.3.1.3 EXTRACCIÓ DE DNA I AMPLIFICACIÓ DELS GENS 16S RRNA

L'extracció de DNA de la biomassa mostrejada del biofiltre percolador es va realitzar mitjançant el kit *MO-BIO soil DNA extraction kit* (MO-BIO Laboratories Inc). Es va seguir el procediment definit pel fabricant amb algunes modificacions. El temps de vòrtex inicial es va optimitzar a 15 minuts enlloc dels 10 minuts recomanats. Per a l'agitació dels tubs de disrupció es va usar l'adaptador de vòrtex horitzontal, MO-BIO Vortex Adapter tube.

Es va iniciar el procediment d'extracció de DNA segons la quantitat màxima de mostra inicial recomanada pel fabricant. Ràpidament es va homogeneïtzar la mostra en els tubs de disrupció, on la lisi cel·lular es va realitzar per mètodes químics i mecànics. Es van utilitzar diferents solucions al llarg del protocol d'extracció amb l'objectiu final de capturar la totalitat de DNA genòmic en la membrana de sílice d'una columna. Previ a l'elució, el DNA es va tractar amb solucions rentadores per tal d'obtenir el DNA amb la puresa adient per poder se usat en les aplicacions posteriors.

A partir del DNA genòmic extret i mitjançant una parella d'encebadors universals del domini *Bacteria* per a 16S rRNA [8F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') i el 1492R

(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')]] es van amplificar per PCR els fragments corresponents a la subunitat petita dels gens rRNA. Les reaccions de PCR, de 100 µl de volum, es van realitzar usant com a motlle 100 ng del DNA genòmic total extret de la mostra. Cada reacció de PCR contenia, a part del tampó subministrat pel fabricant, MgCl₂ (1.5 mM), nucleòtids (0,2 M de cada nucleòtid), oligonucleòtids (0.6 µM) com a encebadors i 5 unitats enzimàtiques de Taq polimerasa (Roche Diagnostics GmbH). Per a l'amplificació de la PCR es va utilitzar un termociclador PTC200 (MJ Research). El programa d'amplificació seguit va ser d'un cicle inicial de 5 min de desnaturalització a 94° C, seguit per 30 cicles de 1 min a 94° C (desnatura lització), 1 min a 55° C (unió dels encebadors) i 1,5 min a 72° C (elongació). A més d'una etapa d'elongació final de 7 min a 72° C. Els productes de PCR obtinguts van ser visualitzats en un gel d'electroforesi d'agarosa al 1.0 % i quantificats mitjançant un espectrofotòmetre UV de microvolums (NanoDrop® ND-1000, ThermoScientific).. Prèviament a la construcció de la llibreria de clons, els productes de la PCR van ser purificats usant el HighPure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH)

3.3.1.4 ELECTROFORESIS EN GEL D'AGAROSA I ESPECTROFOTÒMETRE UV

Tant després de les extraccions de DNA com posteriorment en les amplificacions per PCR, les mostres de DNA van ser carregades en gels d'agarosa al 1.0 % per a visualitzar-ne els rendiments. Les electroforesis es van realitzar amb tampó TAE 1.0% (w/v) i van ser tenyides amb bromur etidi (0.5 µg·ml⁻¹) per a la visualització dels àcids nucleics. Els marcadors de DNA usats per estimar la longitud dels fragments amplificats van ser el DNA 1 Kb DNA ladder (Invitrogen) i el de 100b (Roche Diagnostics GmbH). El DNA es va visualitzar sota llum ultraviolada després de dur a terme l'electroforesi segons el protocol Sambrook *et al.* (1989). Les fotografies dels gels es van obtenir amb l'Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak).

El DNA i les amplificacions de PCR també es van analitzar mitjançant l'espectrofotòmetre Nanodrop® (ThermoScientific), permetent quantificar les concentracions d'àcids nucleics així com determinant la puresa del DNA en base la relació d'absorbàncies a 260nm i 280nm (Glasel, 1995).

3.3.1.5 CONSTRUCCIÓ DE LES LLIBRERIES DE CLONS

Els productes de PCR van ser lligats al vector pCR 4-TOPO (TOPO TA cloning Kit for Sequencing, Invitrogen). Aquest kit permet el clonatge directe dels productes d'amplificació de PCR en un vector plasmídic gràcies a la presència, en aquest, d'extrems cohesius amb una desoxitimidina lliure (3'-T) i el fet que, l'enzim Taq polimerasa utilitzat en les amplificacions, presenta la activitat transferasa terminal que addiciona a l'extrem 3' dels productes amplificats una desoxiadenosina. Aquesta complementaritat entre els extrems cohesius presents en el vector de clonació i en el producte d'amplificació facilita la lligació. A més la reacció de lligació, es veu afavorida per la presència d'una topoisomerasa unida al vector, que catalitza la lligació de l'insert en el vector. Una altra de les característiques destacables del kit pCR®4-TOPO® és que permet la selecció directa dels clons transformants que han incorporat l'insert en el vector gràcies a la disrupció, en el moment de la clonació, del gen letal *ccdB* d'*E.coli* present en el vector. Per tant, aquelles cèl·lules que incorporen en el procés de transformació un vector sense insert, moriran per l'expressió del gen *ccdB*, pel contrari, aquelles cèl·lules que rebin un plasmidi que hagi incorporat l'insert truncant el gen *ccdB*, no podran produir la toxina i si que podran sobreviure. A més, i com a sistema de doble control, per poder descartar també de forma directa els possibles mutants espontanis del gen letal *ccdB*, aquest està fusionat amb el gen que codifica el fragment LacZ α . De manera que la interrupció del gen *ccdB* per la incorporació de l'insert també evita l'expressió de la proteïna híbrida LacZ α -CcdB permeten no només la supervivència de les cèl·lules sinó també que aquestes tinguin un fenotip lactosa negatiu en creixement en plaques selectives amb algun indicador per determinar la capacitat de degradació de lactosa dels clons que hi creixin.

Un cop purificats, els productes d'amplificació de PCR van ser lligats seguint les recomanacions del fabricant al vector pCR 4-TOPO (TOPO TA cloning Kit for Sequencing, Invitrogen). Les reaccions de clonatge es van realitzar segons les descripcions comercials amb la proporció de 4 μ l de producte de PCR, 1 μ l de vector TOPO i 1 μ l de solució salina. Seguint les recomanacions del fabricant per a fragments majors a 1 Kb, el temps d'incubació es va augmentar de 5 a 30 minuts per tal d'obtenir uns majors rendiments. La temperatura d'incubació va ser de 23° C durant tota la incubació. Posteriorment, es van transformar a la soca competent d'*Escherichia coli* TOP10 segons les indicacions del fabricant. Per a cada reacció de transformació, es van afegir 2 μ l de la solució *TOPO® Cloning reaction* al vial *OneShot® Chemically Competent E.coli* i es va incubar en gel durant 30 minuts. Seguidament, cada transformant es va sotmetre a un xoc tèrmic de 42° C durant 30 segons i ràpidament es va tornar a incubar en gel. A continuació es van afegir 250 μ l

de medi SOC (veure annex) per reacció i es van incubar els transformants a 37° C durant una hora amb agitació constant, permetent així l'expressió fenotípica dels gens encarregats dels mecanismes de resistència antibiòtica. Amb l'objectiu d'optimitzar la densitat de colònies es van sembrar 3 volums diferents (10, 50 i 100 µl) de cèl·lules transformants en plaques LB suplementades amb ampicil·lina (50 µg ml⁻¹) i es van incubar durant tota la nit. Un total de 150 clons transformants van ser resembrats en noves plaques pel seu posterior ús. D'aquests, 50 clons van ser glicerinat i conservats a -80°C i els 100 restants van ser processats per a la seva seqüenciació dels fragments clonats. Aquest procediment es va realitzar per duplicat, generant una llibreria de 100 clons a partir del mostreig del dia 42 i una altre llibreria de 100 clons més a partir de la biomassa presa el dia 189 d'operació.

3.3.1.6 EXTRACCIÓ DE DNA PLASMÍDIC I SEQÜENCIACIÓ

A partir de cada un dels clons seleccionats es va preparar un cultiu de 1 ml de medi LB líquid suplementat amb ampicil·lina (50 µg ml⁻¹) que va ser incubat en agitació durant 16h. Un cop crescuts cada un dels clons es va procedir a l'extracció del DNA plasmídic mitjançant el kit Quiagen QIAprep Spin Miniprep®. En aquest cas les cèl·lules van ser lisades en una solució alcalina amb presència de dodecilsulfat sòdic (SDS) i RNasa A. El SDS és un detergent que solubilitza els fosfolípids i els components proteics de la membrana cel·lular, promovent la lisi i l'alliberació del contingut cel·lular al medi, al mateix temps que les condicions alcalines, desnaturalitzen els cromosomes, plasmidis i proteïnes. D'acord amb el protocol establert pel fabricant, el temps de lisi va ser optimitzat per a l'alliberació del DNA d'origen plasmídic i no el d'origen cromosòmic. El lisat cel·lular va ser neutralitzat i ajustat amb tampó d'alta concentració salina, forçant la precipitació de proteïnes desnaturalitzades juntament amb el DNA cromosòmic i restes cel·lulars. Finalment, el DNA plasmídic va ser renaturalitzat i estabilitzat en una membrana on va ser rentat i eluït sota condicions de baixa concentració salina. Per determinar la integritat del DNA es va realitzar una electroforesi en gel d'agarosa 1.0 % i es va determinar la seva concentració i puresa mitjançant l'espectrofotòmetre Nanodrop®.

Les reaccions de seqüenciació es van dur a terme pel servei de seqüenciació de la companyia MacroGen (Korea) mitjançant el kit *Big Dye Terminator version 3.1 sequencing kit* i el sequenciador automàtic ABI3730XL (AppliedBiosystems, EEUU). Per a cada reacció de seqüenciació es van usar 20 µL de DNA plasmídic (>100 ng/µL).

Els plasmidis purificats amb l'insert clonat van ser seqüenciats usant dos encebadors T3 (5'-ATTAACCCCTCACTAAAG-3') i T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') generant 2 seqüències complementàries en l'extrem 3' per a cada clon processat.

3.3.1.7 ANÀLISI BIOINFORMÀTICA DE LES SEQÜÈNCIES

Conjuntament a la informació de seqüència per a cada reacció de seqüenciament, la companyia Macrogen proporciona un índex de qualitat relacionat a cada lectura de seqüenciament. Els "Phred values", es consideren un puntuació de cada nucleòtid generat que està relacionada logarítmicament a la probabilitat d'error d'aquest (taula 3.1). Avaluant les puntuacions de Phred referides als nucleòtids seqüenciats es va valorar la qualitat de les seqüències. De manera que com major nombre de bases amb Q>20, major fiabilitat de seqüència.

Taula 3.1 Relació existent entre els valors de Phred i la qualitat de la seqüenciament.(Ewing *et al.*, 1998)

Puntuació de Qualitat Phred	Probabilitat de base errònia	Precisió de la base anotada
10	1 en 10	90%
20	1 en 100	99%
30	1 en 1.000	99,9%
40	1 en 10.000	99,99%
50	1 en 100.000	99,999%

L'assemblatge de les seqüències obtingudes per generar una seqüència única de cada insert es va realitzar mitjançant el programa *Orientation Checker v.1.0* (Cardif School of Biosciences). Una simple eina informàtica per a la ràpida localització de seqüències parcials dins del gen 16S rRNA, permeten la reorientació de les pròpies seqüències. Programa lliure disponible a la web: <http://www.bioinformatics-toolkit.org/index.html>.

Per tal de delimitar les seqüències estrictament als fragments de 16S i eliminar residus de vector, es van localitzar les seqüències dels encebadors universals usats i es van descartar aquells nucleòtids externs al fragment. El programa utilitzat per a la manipulació i organització de les seqüències va ser el CLONE MANAGER 5 v.5.2. Un cop obtinguda la seqüència de l'insert sense restes del vector de clonació es va continuar amb l'assemblatge de les seqüències mitjançant l'eina informàtica CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>; Huang *et al.*, 1999), resultant una longitud d'inserts clonats aproximadament de 1500pb (corresponents al fragment entre posicions 8 i 1492 en el gen *E.coli* 16S rRNA).

Prèviament a la primera cerca d'afiliació filogenètica de les diferents lectures, es van sotmetre totes les seqüències a diferents eines informàtiques per a assegurar-ne la

qualitat de les seqüències. El programa CHIMERA_CHECK del Ribosomal Database Project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>; Maidak *et al.*, 2000) i el servidor Bellerophon (<http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>; Huber *et al.*, 2004) van ser usats per a la detecció de possibles productes quimèrics. Totes les seqüències de 16S rDNA comparteixen un alt grau de homologia degut l'elevat grau de conservació propi dels gens 16S rRNA. La formació de quimeres durant el procés d'amplificació per PCR dels fragments de 16S es degut a que, en un determinat moment, s'interromp la síntesi d'una seqüència en concret i posteriorment es reprèn des d'una altre seqüència motlle amb la que comparteix un alt grau d'homologia amb la inicial. Clarament la formació quimèrica té una especial incidència en mostres complexes que presenten diferents motlles de DNA en l'amplificació. La formació de quimeres és l'accident més freqüent en seqüències gèniques 16S rRNA sotmeses a bases de dades públiques (Ashelford *et al.*, 2005).

Després de descartar les seqüències quimèriques, es va procedir a la cerca per similitud mitjançant el programa BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Altschul *et al.*, 1997) per a obtenir una primera associació filogenètica dels clons. Així com també es va utilitzar el Ribosomal Data Project II (RDP II) (<http://rdp.cme.msu.edu/>; Cole *et al.*, 2009) per alinear i classificar filogenèticament les seqüències obtingudes dels gens 16S rRNA.

a) ARB, programari per a l'entorn de dades de seqüències

Paral·lelament al procediment descrit, el conjunt de seqüències dels gens 16S rRNA obtingudes per seqüenciació van ser introduïdes al programa ARB (<http://www.arb-home.de/>; Ludwig *et al.*, 2004). El projecte ARB es va iniciar fa més de 15 anys pel professor Wolfgang Ludwig de la Technische Universität München, com una iniciativa per afrontar i integrar el creixent augment d'informació de seqüència rRNA, així com un aplicatiu d'eines informàtiques per a l'anàlisi i manipulació de les dades de seqüència. El programari d'ARB està configurat amb una interfície gràfica que permet la visualització i gestió de bases de dades al mateix temps que integra diferents eines per a l'estudi i manipulació de la informació de seqüències. El programa únicament és sostenible en un sistema operatiu basat en UNIX® com és el cas de Linux. Concretament el sistema operatiu usat per a la instal·lació del programari ARB va ser el distribuït per UBUNTU, de la família GNU/Linux.

Les bases de dades oficials utilitzades pel programa ARB són les desenvolupades en el projecte SILVA rRNA Database (<http://www.arb-silva.de/>; Pruesse *et al.*, 2007),

projecte que recentment ha actualitzat el seu recull de bases de dades en la versió SILVA 106 (Abril de 2011). No obstant per aquest estudi, la base de dades configurada al programa ARB va ésser la d'una versió prèvia (SILVA SSU Ref, release 96, Setembre de 2008) i únicament composta per seqüències de subunitats petites del rRNA. En aquest sentit es van usar més de 320.000 seqüències completes per a la construcció del *Positional Tree Server* (PT_Server). L'arquitectura interna del programa ARB (fig. 3.1) requereix la creació de PT_Servers pel funcionament de les diferents funcions i eines de l'ARB. El PT_Server és una subbase de dades amb un format diferent que permet al programa accedir, de manera ràpida i ordenada, a les dades de seqüència que el conformen per tal de poder-hi treballar. La creació d'un PT_Server requereix d'unes quantes hores de càlcul que depenen principalment de la memòria RAM disponible i de les dimensions de la base de dades. Però que un cop constituït permet una ràpida anàlisi de la pròpia base de dades mitjançant les eines integrades com són el *Fast_Aligner*, el *Probe_Design* i *Probe_Match*, i l'aplicació *Search and Query*.

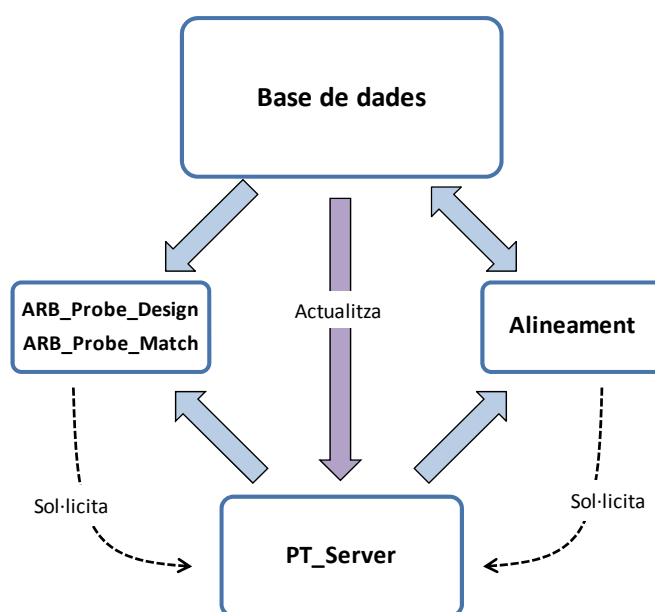


Figura 3.1 Esquema de l'arquitectura interna del programa ARB

Com a primera acció, les seqüències van ser importades al programa en format FASTA, i seguidament es van alinear en l'editor de seqüències *ARB Editor4*. Es va realitzar un primer alineament de cada una de les seqüències utilitzant l'eina automàtica *ARB ToolFast_Aligner*, i posteriorment es va corregir i optimitzar l'alineament de manera manual usant l'editor d'ARB. La correcció manual de cada una de les seqüències, es va fer comparativament tenint en compte la seqüència i estructura secundària de la molècula de 16s rRNA de l'espècie *E.coli*, ja que

l'estructura secundària està íntimament supeditada a la pròpia seqüència (Batey *et al.*, 1999). D'aquesta manera es va optimitzar l'alineament de les seqüències i conseqüentment, també la reconstrucció filogenètica de les mateixes.

Amb l'aplicació *Search and Query* es va explorar el PT_Server creat per a buscar les espècies més pròximes relatives a les dades de seqüència. Per a la reconstrucció filogenètica definitiva es va partir de l'arbre filogenètic existent en la base de dades SILVA96 SSU Ref. Les seqüències importades de la llibreria de clons es van seleccionar dins la base de dades amb l'eina *Search and Query*, i es van afegir a l'arbre filogenètic existent amb el programa ARB_Parsimony, el qual no afecta a la topologia inicial de l'arbre filogenètic. En les opcions de configuració de l'ARB_Parsimony es va definir el filtre *Position_Variability_by_Parsimony* per excloure les posicions de seqüència amb alta variabilitat, resultant en un total de 1.302 columnes vàlides pel càlcul de la distribució filogenètica dins l'arbre existent.

Focalitzant l'arbre filogenètic en els grups d'interès, es va reduir la topologia de l'arbre eliminant part de les seqüències. Es va mantenir una seqüència representativa de cada unitat taxonòmica operacional (OTU) així com varies seqüències de la base de dades, pròximes filogenèticament a cada OTU.

b) Anàlisis DOTUR i cobertura

Es van calcular les distàncies relatives entre les seqüències usant l'aplicatiu DNAdist del programari PHYLIP. El programa DOTUR (Schloss i Handelsman, 2005) va ser utilitzat per assignar les diferents seqüències als OTUs definits en base a l'algorisme "furthest neighbor". Es va definir un 3% de nivell de distància per a un mateix OTU a nivell d'espècie (Nelson *et al.*, 2007). Les corbes de rarefacció es van obtenir a partir del programa DOTUR. La riquesa d'espècies de la llibreria de clons així com els índex de dominància d'espècies i d'uniformitat van ser calculats en base al nombre d'OTUs identificats pel programa DOTUR. A més es van calcular índexs de diversitat biològica per tal de mesurar la biodiversitat de ecosistema. L'índex de Shannon (H') mesura la biodiversitat tenint en compte el nombre d'espècies i la seva uniformitat. (Equació 3.1)

Equació 3.1

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

On p_i és l'abundància relativa de cada espècie, calculada com la proporció d'individus d'una espècie donada (n_i) al número total d'individus de la comunitat (N). S és el número d'espècies.

L'índex d'uniformitat de Pielou (E) quantifica numèricament com de iguals són les poblacions en una comunitat. (Equació 3.2 i 3.3)

Equació 3.2

$$E = \frac{H'}{H'_{max}}$$

On H' és el número derivat del índex de diversitat de Shannon i H'_{max} és el valor màxim de H'

Equació 3.3

$$H_{max} = - \sum_{i=1}^S \frac{1}{S} \ln \frac{1}{S} = \ln S$$

L'índex de dominància de Simpson (D) representa la probabilitat de que dos individus escollits al atzar en l'hàbitat pertanyin a la mateixa espècie (Equació 3.4)

Equació 3.4

$$D = \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

On S és el número d'espècies, N és el percentatge total de cobertura o el nombre total d'organismes i n és el percentatge de cobertura d'una espècie o el nombre d'organismes d'una espècie.

La cobertura de la llibreria de clons construïda es va calcular segons l'equació 3.5 on n és el número de clons únics i N és el número total de clons examinats (Ravenschlag *et al.*, 1999).

Equació 3.5

$$C = 1 - (n/N)100$$

3.3.1.8 NOMBRES D'ACCÉS DE LES SEQÜÈNCIES DE NUCLEÒTIDS

Les seqüències parcials dels gens 16S rRNA obtingudes de les llibreries de clons van ser incorporades a la base de dades de l'EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl>) en tres propostes diferents, i van ser anotades amb els números d'accés des del FM165203 al FM165231, FM174321 al FM174366 i FM212988 al FM213080.

3.3.2 HIBRIDACIÓ *IN SITU* PER FLUORESCÈNCIA PEL SEGUIMENT DE POBLACIONS MICROBIANES

A partir de la informació de seqüència obtinguda en la seqüenciació de les llibreries de clons construïdes es va plantejar un estudi pel seguiment i quantificació de determinades espècies mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ* per fluorescència (FISH).

Aquest treball es va emmarcar al voltant d'una nova posada en marxa del biofiltre percolador després de substituir-ne el material de rebliment. Es va canviar el rebliment plàstic HD-QPAC® (Lantec Products Inc) per anelles d'acer inoxidable tipus Pall (Croft Engineering Services).

Diferents mostres de biomassa van ser preses durant la nova posada en marxa i operació del biofiltre percolador. Obtenint biomassa de diferents seccions del cos del bioreactor, generant una bateria de mostres susceptibles de ser hibridades *in situ* amb sondes fluorescents específiques d'espècies o grups de bacteris.

3.3.2.1 MUNTATGE EXPERIMENTAL

El bioreactor experimental del que es va realitzar l'estudi de seguiment de microorganismes mitjançant la tècnica FISH, va ser una modificació del biofiltre percolador d'escala de laboratori dissenyat pel Dr. Fortuny i presentat en els estudis anteriors (secció 3.3.1.1). Els nous objectius definits al voltant de l'estudi de les comunitats microbianes presents al biofiltre van conduir a la modificació del cos del biofiltre per tal de facilitar i permetre el mostreig de biomassa a diferents altures, minimitzant l'impacte en l'operació del bioreactor.

El muntatge experimental va consistir en un biofiltre percolador convencional a escala de laboratori (fig 2.1), configurat amb un compartiment auxiliar pel subministrament d'oxigen. Comparativament amb la configuració anterior es va canviar el material de rebliment utilitzat i es va seccionar el cos del bioreactor a tres alçades. El material de rebliment va ser substituït per un llit desordenat format per anelles d'acer inoxidable tipus Pall de 10 mm de diàmetre. Una detallada descripció de la conformació del biofiltre així com de la configuració de la posada en marxa i operació han estat presentats en el capítol 2 d'aquesta tesi.

3.3.2.2 MOSTREIGS DE BIOMASSA

Amb l'objectiu d'aplicar la tècnica FISH per a l'estudi de la dinàmica de poblacions durant la posada en marxa del bioreactor eliminant altes càrregues de H₂S, es va

mostrejar biomassa del biofiltre a diferents moments del període operacional. Com a mostra inicial (dia 0) es va considerar una fracció de l'inòcul utilitzat en la posada en marxa del sistema. Posteriorment es van realitzar mostres al llarg de l'operació, obtenint biomassa els dies 26, 84 i 245 d'operació.

Les mostres de biomassa mostrejades van ser extretes a partir de tres ports de mostreig ubicats a diferents longituds del cos empaquet del biofiltre. Respecte una longitud total de material de rebliment empaquet de 53 cm, la biomassa obtinguda del port ubicat a 4 cm de la base va ser referida com a mostra "baixa", la mostrejada a 23 cm de la base com a mostra "mitja" i la obtinguda de la zona més superior, a 40 cm, com a mostra "alta". La biomassa de cada una de les zones es va obtenir a partir del mostreig d'unes 10 anelles Pall (aprox.), forçant el despreniment del biofilm amb agitació en tampó PBS 1X. Abans de reiniciar l'operació del biofiltre es van reintroduir les mateixes anelles Pall del mostreig a la seva secció d'origen. Durant els mostres, la interrupció de l'operació en cap moment va sobrepassar els 15 minuts.

3.3.2.3 HIBRIDACIÓ *IN SITU* PER FLUORESCÈNCIA (FISH)

En base a la informació de seqüència obtinguda en la seqüenciació de les llibreries de clons construïdes, es van escollir varies espècies de microorganismes amb capacitat sulfur-oxidant com a dianes d'estudi en el seguiment i quantificació de microorganismes al llarg de l'operació del biofiltre, mitjançant la tècnica FISH. Les sondes d'oligonucleòtids específiques seleccionades per a l'estudi van ser buscades i comprovades a la base de dades *ProbeBase* (<http://www.microbial-ecology.net/probebase/>; Loy *et al.*, 2003). Les sondes d'oligonucleòtids, portadores d'un fluorocrom a l'extrem 5', van ser sintetitzades per Thermo Scientific Biopolymers. En alguns casos, per a la hibridació d'algunes de les sondes específiques, va ser necessària la utilització de sondes competidores no marcades (veure taula 3.5).

Seguidament a cada un dels mostres de biomassa del biofiltre, es va procedir amb la fixació de la biomassa com a tractament inicial. Amb la fixació de la biomassa s'aconsegueix per un costat la permeabilització de les cèl·lules i per altre costat la conservació de la mostra. D'aquesta manera es facilita la penetració de les sondes fluoromarcades a l'interior dels bacteris i es protegeix el RNA de la degradació per RNases endògenes. Posteriorment a la fixació, les mostres van ser conservades a -20°C permetent, per a una mateixa mostra, la hibridació d'una gran varietat de sondes. El protocol seguit per a la tècnica FISH va ser el definit per la Dra. Irene Jubany, com una adaptació a partir dels treballs de Hugenholtz *et al* (2001) i Manz *et al.* (1992).

En l'annex es mostren les diferents solucions i tampons utilitzats en la metodologia que es descriu a continuació.

Fixació de la mostra: Per a la fixació de la biomassa es van mesclar 3 volums de Paraformaldehid (PFA) 4% (1.5 mL) amb 1 volum de mostra (0.5 mL). La biomassa amb el PFA es va incubar a 4°C durant 1-3 h. Posteriorment es va centrifugar (5.000 g) per a concentrar-ne totes les cèl·lules. Es va descartar la solució fixadora i les cèl·lules van ser rentades dos vegades amb PBS 1x. Després dels rentats es va resuspendre les cèl·lules en 1 volum (0.5 mL) de PBS 1x amb 1 volum (0.5 mL) d'etanol -20°C. En aquest punt les cèl·lules fixades poden ser processades per a la hibridació o bé conservades a -20°C.

Aplicació de la mostra al portaobjectes: Es van dipositar de 5 a 20 µL (en funció de la concentració) de la mostra fixada a cada concavitat del portaobjectes i es va deixar assecar per incubació seca (màx. 60°C). Seguidament es va deshidratar la mostra per series de banys en etanol (3 minuts per cada concentració): 50%, 80% i 96% i finalment es va deixar assecar el portaobjectes a l'aire.

Hibridació de la sonda: El tampó d'hibridació es va preparar en tubs eppendorfs de 2 mL just en el moment de ser utilitzat (veure la taula 3.2). Es va afegir 8 µL del tampó d'hibridació preparat a cada concavitat del portaobjectes amb la mostra deshidratada. Amb la solució d'hibridació sobrant es va decantar sobre un paper absorbent col·locat dins el tub d'hibridació (tub falcon 50 mL) amb l'objectiu de crear una atmosfera humida dins el tub. Es van afegir 0.5 -1 µL de l'alíquota de la sonda en qüestió (50 ng/µL) a cada pou del portaobjectes, i es van mesclar cuidadosament. Finalment es va col·locar el portaobjectes dins el tub d'hibridació humidificat, que va ser tapat i incubat a les fosques, en un incubador a 46°C durant 2 hores. En funció del % de formamida necessari (veure taula 3.3) es van poder hibridar simultàniament varies sondes per a una mateixa mostra.

Taula 3.2. Composició del tampó d'hibridació. Per a les concentracions de formamida veure la taula de concentracions 1 de l'annex.

Component	Concentració final	Volum per preparar 2 mL
5M NaCl	900 mM	360 µL
1M Tris/HCl	20mM	40 µL
SDS 10 %	0.01 %	2 µL
Formamida	0-80 % ⁽¹⁾	0-1600 µL ⁽¹⁾
Aigua MilliQ	-	fins a 2 mL

⁽¹⁾La concentració de formamida depèn de la sonda utilitzada (taula 3.5)

Taula 3.3. Llistat de sondes d'oligonucleòtids utilitzats en el seguiment per FISH.

Sonda	Especificitat	Formamida (%)	Referència	Seqüència (5'-3')	Fluorocrom (5'-)
EUB338^a	majoria de <i>Bacteria</i>	0-50 ^b	Loy <i>et al.</i> (2003)	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Cy5
EUB338-II^a	altres <i>Bacteria</i> no detectades amb EUB338	0-50 ^b	Loy <i>et al.</i> (2003)	GCAGCCACCCGTAGGTGT	Cy5
EUB338-III^a	altres <i>Bacteria</i> no detectades amb EUB338	0-50 ^b	Loy <i>et al.</i> (2003)	GCTGCCACCCGTAGGTGT	Cy5
ALF968	α – proteobacteris	20	Loy <i>et al.</i> (2003)	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	Cy3
BET42a	β – proteobacteris	35	Loy <i>et al.</i> (2003)	GCCTTCCCACCTTCGTTT	Cy3
-	Competidor per BET42a	35	Loy <i>et al.</i> (2003)	GCCTTCCCACATCGTTT	Cy3
GAM42a	γ – proteobacteris	35	Loy <i>et al.</i> (2003)	GCCTTCCCACATCGTTT	Cy3
-	Competidor per GAM42a	35	Loy <i>et al.</i> (2003)	GCCTTCCCACCTTCGTTT	Cy3
EP402-423	ε – proteobacteris	30	Takai <i>et al.</i> (2004)	GAAAKGYGTCATCCTCCACG	Cy3
G123T	<i>Thiothrix eikelboomii</i> , <i>T. nivea</i> , <i>T. unzii</i> , <i>T. fructosivorans</i> , <i>T. defluvii</i> , <i>Eikelboom type 021N group I, II, III</i>	40	Cytryn <i>et al.</i> (2006)	CCTTCCGATCTCTATGCA	Cy3
-	Competidor per G123T	40	Takai <i>et al.</i> (2004)	CCTTCCGATCTCTACGCA	Cy3
TMD131	<i>Sulfurimonas denitrificans</i>	35	Fernández <i>et al.</i> (2008)	TCCCAGTCTTTGAGGTAC	Cy3
S-SH.neap-635-a-A-19	<i>Halothiobacillus neapolitanus</i>	35	Okabe <i>et al.</i> (2007)	TAGAATCCCAGTATCCAAT	Cy3
TBD1419	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	50	Fernández <i>et al.</i> (2008)	ACTTCTGCCAGATTCCAC	Cy3
S-S-T.int-0442-a-A-18	<i>Thiomonas intermedia</i>	10	Okabe <i>et al.</i> (2007)	TCGATATTTGCCCCCGC	Cy3
TM2G0138	Group 2 <i>Thiomonas</i>	40	Hallberg <i>et al.</i> (2006)	GTAGTTATCCCCCATCACA	Cy3

^a EUB338, EUB338-II, EUB338-III van ser utilitzats com una combinació de les 3 anomenades EUB338_{mix}.

^b Rang aplicable. El percentatge de formamida vindrà definit pel requerit per la sonda específica.

Rentat de la hibridació: Durant les dues hores d'incubació de la hibridació, es va preparar la solució de rentat i es va escalfar a 48°C en un bany (veure taula 3.4). Es va preparar un volum de solució de rentat suficient per a submergir el portaobjectes.

Taula 3.4 Composició de la solució de rentat. Per a les concentracions de NaCl i EDTA veure la taula de concentracions 1 de l'annex.

Component	Concentració final	Volum per preparar 50 mL
5M NaCl	0-900 mM ⁽¹⁾	0-9 mL ⁽¹⁾
0.5M EDTA	0-5 mM ⁽²⁾	0-500 µL ⁽²⁾
1M Tris/HCl	20 mM	1 mL
SDS 10 %	0.01 %	50 µL
Aigua MilliQ	-	fins a 2 mL

⁽¹⁾La concentració de NaCl depèn de la concentració de formamida en el tampó d'hibridació.

⁽²⁾La concentració d'EDTA depèn de la concentració de formamida en el tampó d'hibridació.

Després del període d'hibridació, es van rentar els portaobjectes amb la solució de rentat prèviament escalfada, deixant fluir suaument la solució per cada una de les concavitats de la preparació. Posteriorment els portaobjectes es van submergir en els tubs amb solució de rentat i es van incubar en un bany a 48°C durant 15 minuts. La transició ràpida dels portaobjectes des dels tubs d'hibridació als tubs amb la solució de rentat (prèviament escalfada) minimitza les unions inespecífiques de sonda degudes a la disminució de la temperatura.

Després de la incubació en la solució de rentat, els portaobjectes van ser esbandits suaument amb aigua MilliQ. L'aigua es va aplicar directament sobre els pous deixant que fluís per tots ells. Després dels diferents rentats, es van assecar tots els pous aplicant un flux d'aire comprimit sobre les mostres.

Contenció de les mostra: prèviament a l'observació de la mostra al microscopi és necessari aplicar un medi de muntatge a la preparació. Per això es va afegir a cada pou, directament sobre la biomassa hibridada, unes petites gotes del reactiu anti-blanquejant Citifluor. D'aquesta manera s'eviten pèrdues d'intensitat de fluorescència prèviament a la captura d'imatges. Després d'afegir el Citifluor, per finalitzar la preparació es va cobrir el portaobjectes amb un cobreobjectes. Arribats a aquest punt les preparacions poden ser observades al microscopi confocal o bé conservades a -20°C durant setmanes sense pèrdua de fluorescència.

Visualització al Microscopi: La observació de les preparacions es va realitzar al microscopi confocal Olympus FluoView™ FV1000 (Olympus Corporation). Configurant els làsers i filtres adequats per a l'observació de les sondes marcades. (veure taula 3.5).

Taula 3.5 Marcadors fluorescents utilitzats per marcar les sondes d'oligonucleòtids.

Nom	Component	Màxim d'excitació (nm)	Màxim d'emissió (nm)	Color d'emissió	Làser requerit	Emissió Làser (nm)
Cianina Cy3	Sulfoindocianina	550	570	Groc	He-Ne	543
Cianina Cy5	Sulfoindocianina	649	670	Vermell	Kr-Ar/He-Ne	633

Per a cada portaobjectes es van capturar 40 camps visuals diferents repartits pels 7 pous de mostra hibridats amb la sonda específica d'estudi. El vuitè pou de la preparació (mostra sense addició de cap sonda) va ser utilitzat per a capturar 5 fotos més i avaluar la pròpia auto-fluorescència de la mostra.

La quantificació de cada una de les espècies i grups de microorganismes estudiats en les diferents mostres, va ser expressada en forma d'abundància relativa referida a la sonda general EUB338mix (bacteris totals). De manera que l'àrea d'imatge de la sonda específica (marcada amb Cianina Cy3) va ser quantificada com a percentatge de l'àrea d'imatge de la sonda general (EUB338mix marcades amb Cianina Cy5). Una detallada descripció del mètode d'anàlisi d'imatge i quantificació relativa mitjançant el programari Matlab, es pot trobar al treball desenvolupat per Jubany *et al.* (2009).

3.4 RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.4.1 CARACTERITZACIÓ DE LES COMUNITATS BACTERIANES MITJANÇANT LA CONSTRUCCIÓ DE LLIBRERIES DE CLONS PER ELS GENS 16S RRNA

A partir de la construcció de dues llibreries de clons pels gens 16S rRNA, es van obtenir dues fotografies estàtiques de les composicions microbiològiques de les comunitats desenvolupades en el biofiltre percolador. Per a cada un dels mostreigs realitzats en el bioreactor es va obtenir una col·lecció de seqüències gèniques del marcador filogenètic clonat (16S rRNA). En base a l'anàlisi d'aquestes seqüències es va caracteritzar la composició filogenètica de les poblacions microbianes del biofiltre dels dies 42 i 189 d'operació.

A través de la comparació de la caracterització filogenètica obtinguda entre els dos moments d'operació es va observar una evolució de les poblacions al llarg del temps, indicant que durant el temps d'operació del biofiltre es produeix una simplificació i selecció de les comunitats que millor s'adapten a les condicions ambientals pròpies de l'operació del biofiltre percolador.

3.4.1.1 POSADA EN MARXA I OPERACIÓ DEL BIOFILTRE PERCOLADOR

El biofiltre percolador va ser inoculat amb fangs aerobis provinents d'una planta de tractament d'aigües residuals municipals, amb una concentració de sòlids volàtils en suspensió (VSS) de 1.9 g L⁻¹. Durant el període de posada en marcha es va fixar la concentració d'entrada de H₂S a 1000 ppm_v (27.8 g H₂S m⁻³ h⁻¹), que es va prolongar al llarg de tres dies. Ràpidament es va assolir una eficàcia d'eliminació (RE) superior al 99 % que es va mantenir inclús després d'augmentar la concentració d'entrada a 2000 ppm_v (càrrega de 55.6 g H₂S m⁻³ h⁻¹). Posteriorment a la posada en marcha, el biofiltre percolador va estar operant contínuament (fig. 3.2) amb una concentració d'H₂S entrant de 2000 ppm_v, mantenint el sistema de control de pH a una consigna entre 6.5-7 i amb un excés d'aportació d'oxigen configurat en una ràtio O₂/H₂S alimentat de 23.6 (v v⁻¹). A més, un aportació de carboni inorgànic de 0.71 ± 0.08 g C-HCO₃⁻ g⁻¹ S-H₂S va garantir un excés de carboni disponible al llarg de l'operació (Fortuny *et al.*, 2008).

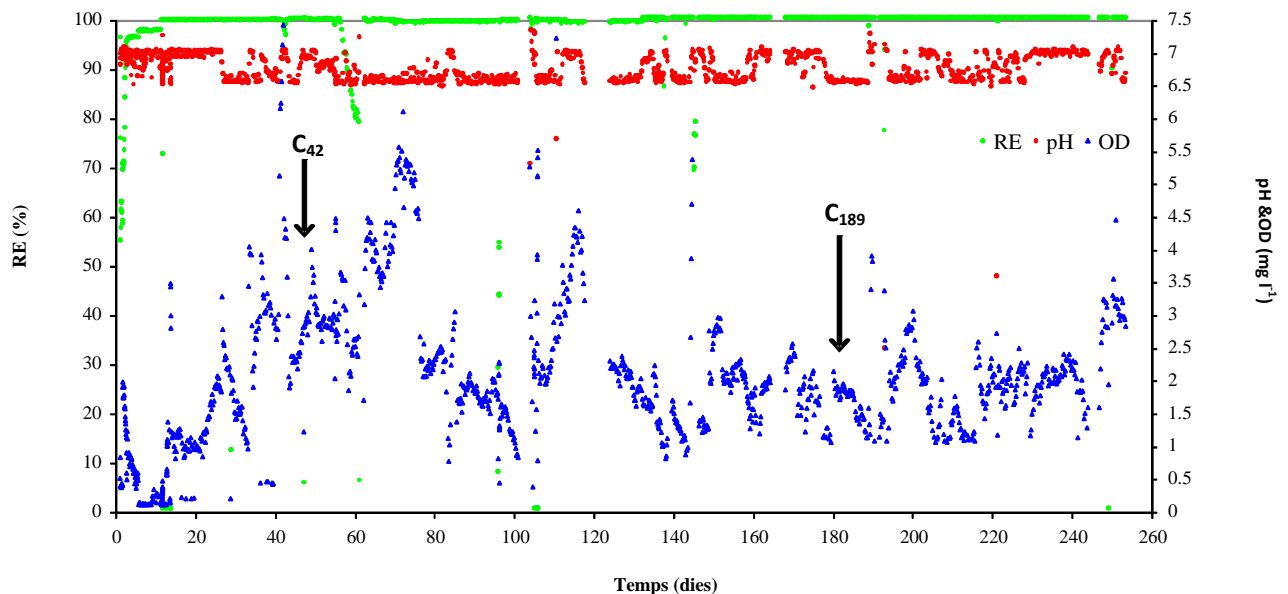


Figura 3.2 Seguiment on-line del biofiltre percolador durant el període operacional en que es van construir les llibreries de clons a partir de la biomassa desenvolupada en el cos del biofiltre. En fletxes verticals es mostren els moments de mostreig. C42: llibreria de clons corresponent al dia 42 d'operació; C189: llibreria de clons corresponent al dia 189 d'operació. És mostren l'eficàcia d'eliminació, el pH i l'oxigen dissolt com a variables de seguiment.

Les condicions operacionals anteriorment mencionades es van mantenir constants al llarg dels 260 dies considerats, resultant en una operació estable i controlada assolint una elevada eficàcia d'eliminació al llarg de tot el període. A més, pràcticament

durant tota la operació, es va mantenir una capacitat d'oxidació de sulfur pràcticament completa (superior al 90% del H₂S alimentat) a SO₄²⁻mostrant una mínima acumulació de S⁰ al cos del bioreactor.

3.4.1.2 LLIBRERIES DE CLONS DELS GENS 16S rRNA

Amb intenció d'identificar les poblacions microbianes que es desenvolupen en el biofiltre, així com valorar els canvis poblacionals al llarg del temps, es van construir dues llibreries de clons dels gens 16S rRNA. La primera llibreria es va construir a partir del mostreig realitzat el dia 42 d'operació, referida d'ara endavant com a llibreria C42. Per altre costat, la segona llibreria de clons va ser construïda en base la biomassa mostrejada el dia 189 d'operació i va ser anotada com a llibreria C189. Ambdues llibreries van ser construïdes a partir de les seqüències parcials (>1400 pb) dels gens 16S rRNA, resultant en un total de 100 clons per llibreria que van ser seqüenciats posteriorment. Els resultats de l'associació filogenètica de les llibreries C42 i C189 van ser publicats anteriorment en els treballs de Maestre *et al.* (2009; 2010). L'anàlisi inicial de les 100 seqüències relatives a la llibreria C189 va generar 27 clons potencialment quimèrics que van ser descartats mitjançant el programa Bellerophon (Huber *et al.*, 2004). Les 73 seqüències resultants de la llibreria C189 van ser analitzades filogenèticament i agrupades en unitats taxonòmiques operacionals (OTUs) segons el programa DOTUR (Schloss i Handelsman, 2005) amb l'objectiu de poder-les comparar posteriorment vers les seqüències de la llibreria C42. Referent a la llibreria C42, únicament 10 seqüències van resultar quimeres i van ser descartades, les altres 90 seqüències van ser analitzades filogenèticament i agrupades en OTUs. A partir del conjunt de seqüències 16S rRNA de cada llibreria, es va determinar un 97% de similitud de seqüència mínima per a definir una unitat taxonòmica operacional (Hansel *et al.*, 2008).

L'anàlisi comparatiu directe entre les dues llibreries de clons desenvolupades va ser possible gràcies al fet que ambdues llibreries van ser processades seguint la mateixa metodologia. Es van estimar els índex de diversitat biològica (taula 3.6) per a cada una de les llibreries i es va poder observar que les comunitats estudiades presentaven una menor diversitat de microorganismes que d'altres treballs implementats en biofiltres (Sakano i Kerkhof, 1998; Friedrich *et al.*, 2002).

Taula 3.6 Composició i diversitat de les llibreries de clons 16S rRNA desenvolupades.

Llibreria	Nº clons	Nº OTUs	Cobertura	Shannon índex	Uniformitat d'espècies	Simpson índex
C42	73	37	40.0	3.64	0.91	0.03
C189	90	54	49.3	3.04	0.84	0.08

A partir de la valoració dels índex de Shannon es va observar que la llibreria C42 presentava una major diversitat filogenètica que la llibreria C189, indicant una lleugera simplificació de les comunitats del biofiltre al llarg del temps. A més, la llibreria C42 també presentava un major índex d'uniformitat, fet que reforça la idea d'una major diversitat biològica. Aquests resultats són directament relacionables amb les condicions d'operació del bioreactor al llarg del període considerat. Doncs la llibreria C189 es va construir a partir de biomassa obtinguda el dia 189 d'operació, essent una llibreria basada en una biomassa adaptada durant un llarg període i sota unes condicions altament selectives. En el mateix sentit, els índex de Simpson, els quals són inversament relacionables amb la diversitat, van presentar un menor índex a la llibreria C42 confirmant la major diversitat d'aquesta.

Contraposadament als resultats del càlcul teòric de les cobertures (segons l'equació 3.5) de les llibreries C42 i C189, les corbes de rarefacció desenvolupades amb el programa DOTUR (fig. 3.3) van demostrar que ambdues llibreries de clons presentaven suficient cobertura per descriure la majoria de la diversitat bacteriana existent en les mostres, ja que les dues corbes pràcticament assoleixen la fase de saturació. De manera que, un hipotètic augment en el nombre de clons considerats en cada llibreria no reflectiria un augment del nombre d'OTUs resultants. Així doncs, tant la C42 com la C189 demostren suficient dimensió de clons per estudiar la diversitat filogenètica de les mostres provinents del biofiltre.

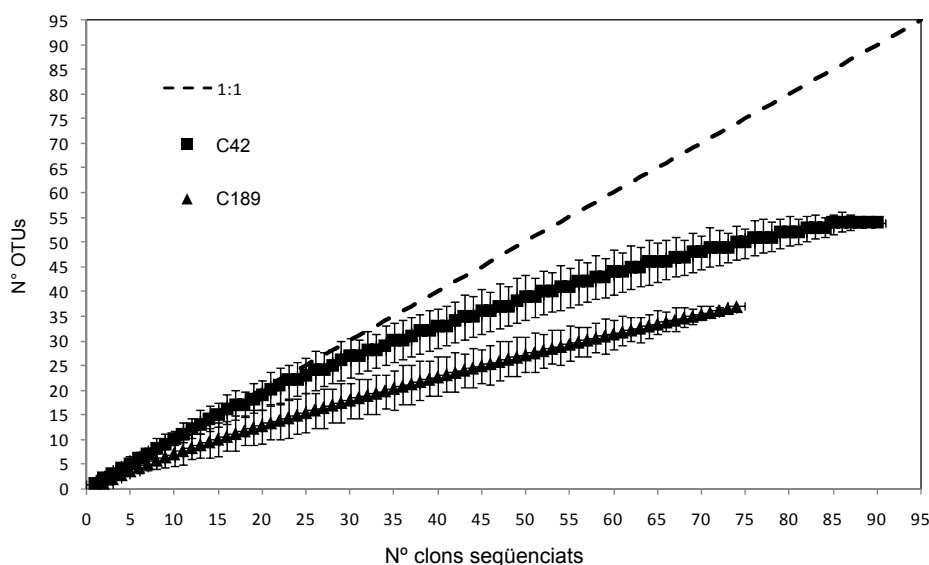


Figura 3.3 Corba de rarefacció calculada pels diferents OTUs obtinguts en cada llibreria de clons. La línia discontinua representa 1:1, indicativa de la diversitat infinita. Els OTUs van ser definits en base grups de seqüències que compartien el 97% de seqüència del 16S rRNA.

3.4.1.3 DIVERSITAT FILOGENÈTICA I EVOLUCIÓ DE LES POBLACIONS SULFUR-OXIDANTS

L'anàlisi filogenètic de les llibreries gèniques ha permès valorar la diversitat microbiana existent del biofiltre en base els dos moments de mostreig. La gran majoria de seqüències pertanyien al *phylum Proteobacteria*, concretament el 91.1% de la llibreria C42, i el 76.7% de la llibreria C189. Per altre banda, la resta de clons d'ambdues llibreries van ser anotats com a membres del *phylum Bacteroidetes*. D'aquesta manera, segons l'estudi filogenètic realitzat, la diversitat existent en el biofiltre percolador va resultar ser menor que la que s'observa en d'altres ambients sulfurosos naturals (Engel *et al.*, 2004; Elshahed *et al.*, 2003).

Respecte el *phylum Bacteroidetes*, la llibreria C42 va presentar una major diversitat d'espècies (5 gèneres i 8 clons), tot i que amb menor abundància que la llibreria C189 (2 gèneres i 17 clons). De la mateixa manera, la composició filogenètica dels clons del *phylum Proteobacteria* diferien considerablement entre les dues llibreries (veure taula 3.7). A la llibreria C42, abundaven els proteobacteris beta (41%), seguits dels gamma (40%) i en menor proporció els delta, els èpsilon i els alfa (3%, 2%, i 1% respectivament). En quant els gèneres, a la llibreria C42 s'hi van identificar 24 gèneres diferents, en canvi, a la llibreria C189 únicament se'n van anotar 11, indicant una simplificació de la diversitat filogenètica entre les dues llibreries. A la llibreria C189 el 49% dels clons van ser anotats com a classe gamma, un 16% com a classe beta, i un 11% com a èpsilon proteobacteris, a diferència de la llibreria C42 on no es van identificar clons de proteobacteris alfa i delta.

La divisió taxonòmica més abundant de la llibreria C42 van ser els proteobacteris beta, on el 31% dels clons estaven relacionats amb espècies del gènere *Thiobacillus* i un 6% relacionats amb el gènere *Thiomonas*. De manera minoritària, es van anotar altres gèneres de proteobacteris beta com són *Zooglea*, *Denitrasoma* i *Ideonella*, que representaven al voltant d'un 4% de la llibreria. Per altre costat, a la llibreria C189, els proteobacteris beta només representaven el 16% dels clons. Tot i que el gènere *Thiobacillus* continuava essent el més abundant (7%) entre la divisió taxonòmica. En aquesta llibreria no es van identificar clons relacionats amb els gèneres *Thiomonas*, *Zooglea* i *Ideonella*, en canvi, sí que es van identificar clons del gènere *Denitrasoma* (3%). A més a més, a la llibreria C189, s'hi van anotar varis clons relacionats amb els gèneres *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* i *Ottowia*, representant un 6% del total de la col·lecció.

Tant a la llibreria C42 com a la C189 es va observar un alt percentatge de clons relacionats amb proteobacteris gamma (40% en la C42 i un 49% en la C189). No

obstant, la distribució de gèneres en cada col·lecció va ser diferent. A la llibreria C42, el gènere més abundant de proteobacteri gamma va ser el gènere *Dokdonella* amb un 21% dels clons, tot i així es van anotar nou gèneres més, relacionats amb aquesta divisió taxonòmica. Els clons relacionats amb aquests nou gèneres: *Frateuria*, *Aquimonas*, *Stenotrophomonas*, *Rhodanobacter*, *Thermomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Halothiobacillus*, *Acidithiobacillus* i *Thiothrix*, van mostrar una escassa presència en la llibreria, on cap d'ells va superar el 3% del total de clons. És notori mencionar que el gènere *Thiothrix*, únicament va representar el 1% dels clons de la llibreria C42, en canvi a la llibreria C189, els clons relacionats amb aquest gènere van resultar el 44% de la col·lecció. Per altre banda, a la llibreria C189, també es van observar altres gèneres relacionats amb proteobacteris gamma, tres clons anotats com a *Dokdonella* i un com a *Xanthomonas*.

Tot i ser present en ambdues llibreries, els proteobacteris èpsilon estaven poc representats en les dues llibreries (2% de la C42 i un 11% de la C189). A la col·lecció C42 únicament s'hi va detectar el gènere *Sulfuricurvum*, i a la llibreria C189 el gènere *Sulfurimonas*. Les classes de proteobacteris alfa i delta, solament van ser relacionades a la llibreria C42, representant només un 4% dels total de clons de la col·lecció. Entre els gèneres identificats, es van anotar *Parvibaculum* (proteobacteri alfa), *Nitrospira* i *Malonomona* (proteobacteris delta).

Referent al *phylum Bacteroidetes*, el clons de la llibreria C42 d'aquesta divisió van ser relacionats amb les classes *Flavobacteria*, *Sphingobacteria* i *Bacteroidetes*, representant un 10% del total de la col·lecció. En canvi, a la llibreria C189, solament es van identificar clons de les classes *Flavobacteria* i *Sphingobacteria*, que majoritàriament van ser anotats com a *Corcinitromix* i *Haliscomenobacter*, representant un 3% i un 20% dels clons, respectivament.

Dels 90 clons obtinguts de la llibreria C42, es van definir 54 OTUs en base al criteri del 97% de similitud de seqüència. De les 54 unitats, 21 OTUs conformats per 38 clons, van mostrar similitud amb bacteris sulfur-oxidants. Entre els més abundants, el gènere *Thiobacillus* (12 OTUs i 31 clons) seguit pels gèneres *Thiomonas*, *Acidothiobacillus*, *Sulfuricurvum*, *Thiothrix* i *Halothiobacillus* (veure taula 3.7). En canvi, per a la llibreria C189 es van definir 37 OTUs a partir dels 73 clons seleccionats seguint la mateixa metodologia. De les 37 unitats taxonòmiques, 19 van ser relacionades amb gèneres de bacteris sulfur-oxidants. Entre les quals, el gènere més abundant va resultar ser *Thiothrix* amb 12 OTUs i 32 clons complementat pel gènere *Sulfurimonas* (3 OTUs i 7 clons), el gènere *Thiobacillus* (3 OTUs i 5 clons) i el gènere *Xanthomonas* amb un únic clon i OTU.

Taula 3.7 Anotació filogenètica de les llibreries de clons C42 i C189. Es mostren els clons amb afiliació filogenètica relacionada amb espècies sulfur-oxidants.

Llibreria	Afilació Filogenètica	Gènere	N° OTUs	Seq. clon rep.	Semblança màx.	N° Acc	Similitud (%)	Semblança màx. relativa	N° Acc	Similitud (%)
C42	β-proteobacteri	<i>Thiobacillus</i>	1,3,4,5,8,11,23,36,38,42,43,45	H2SRC28	Uncultured bacterium	EU266809	93	<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259	CP000116	93
				H2SRC21	Uncultured bacterium	AY945874	92	<i>Thiobacillus aquaesulis</i>	U58019	84
		<i>Thiomonas</i>	15, 35, 49	H2SRC238	<i>Thiomonas</i> sp. B3	AJ549220	98	<i>Thiomonas</i> sp. B3	AJ549220	98
				H2SRC236X	Uncultured bacterium	DQ415765	96	<i>Thiomonas</i> sp. ML1-83	DQ146051	96
	ε-proteobacteri	<i>Sulfuricurvum</i>	16, 44	H2SRC228X	<i>Sulfuricurvum kujiense</i> strain YK-3	AB080644	99	<i>Sulfuricurvum kujiense</i> strain YK-3	AB080644	99
	γ-proteobacteri	<i>Thiothrix</i>	39	H2SRC212X	Uncultured bacterium	AB255070	95	<i>Thiothrix</i> sp. CT3	AF148516	93
		<i>Acidithiobacillus</i>	2, 53	H2SRC210	Uncultured bacterium	DQ303261	92	<i>Acidithiobacillus albertensis</i> strain DSM 14366	AJ459804	92
	<i>Halothiobacillus</i>	19	H2SRC233	Uncultured bacterium	AB255085	93	<i>Thiobacillus</i> sp. UAM-I	AY487255	92	
C189	β-proteobacteri	<i>Thiobacillus</i>	21, 8, 7	H2SRC138X	Uncultured bacterium	AB255070	92	<i>Thiobacillus denitrificans</i> strain ME16	EU546130	88
				H2SRC114	<i>Thiobacillus sajanensis</i> strain 4HG	DQ390445	99	<i>Thiobacillus sajanensis</i> strain 4HG	DQ390445	99
				H2SRC120	Uncultured bacterium	EF467563	95	<i>Thiobacillus plumbophilus</i>	AJ316618	95
	ε-proteobacteri	<i>Sulfurimonas</i>	3, 5, 19	H2SRC121	<i>Sulfurimonas denitrificans</i> DSM 1251	CP000153	99	<i>Sulfurimonas denitrificans</i> DSM 1251	CP000153	99
				H2SRC146	Uncultured bacterium	AB181499	98	<i>Sulfurimonas denitrificans</i> DSM 1251	CP000153	98
	γ-proteobacteri	<i>Xanthomonas</i>	11	H2SRC148	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	AB101447	92	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	AB101447	92
		<i>Thiothrix</i>	1,2,4,6,17,26,27,28,29,30,31,32	H2SRC15	<i>Thiothrix lakustris</i> strain BL	EU642572	99	<i>Thiothrix lakustris</i> strain BL	EU642572	99
				H2SRC112	<i>Thiothrix</i> sp. CT3	AF148516	96	<i>Thiothrix</i> sp. CT3	AF148516	96
			H2SRC144X	Uncultured bacterium	EU340200	97	<i>Thiothrix</i> sp. CT3	AF148516	96	

Les diferències filogenètiques entre les dues llibreries de clons generades demostren l'adaptació i selecció de les poblacions que es desenvolupen en el biofiltre percolador de dessulfuració. Segons les llibreries construïdes es va poder observar una evolució de les comunitats, amb dominància de les espècies sulfur-oxidants. En concordança amb els resultats de Snaidr *et al.* (1997), les espècies amb capacitat sulfur-oxidant no resulten predominants en els fangs aerobis (inòcul), a excepció de les situacions de *bulking* operacional de les plantes de tractaments d'aigües residuals que sovint estan relacionats amb espècies de *Thiothrix*. No obstant, la ràpida aclimatació i adaptació de les comunitats observada a partir de la llibreria C42, suggereix una minoritària, però incipient, presència de microorganismes amb capacitat sulfur-oxidant en l'inòcul inicial. Al cap de 42 dies d'operació, pràcticament el 50% dels clons de la llibreria van mostrar afiliació amb espècies relacionades amb el cicle del S⁰, indicant una ràpida evolució degut a les selectives condicions operacionals del biofiltre.

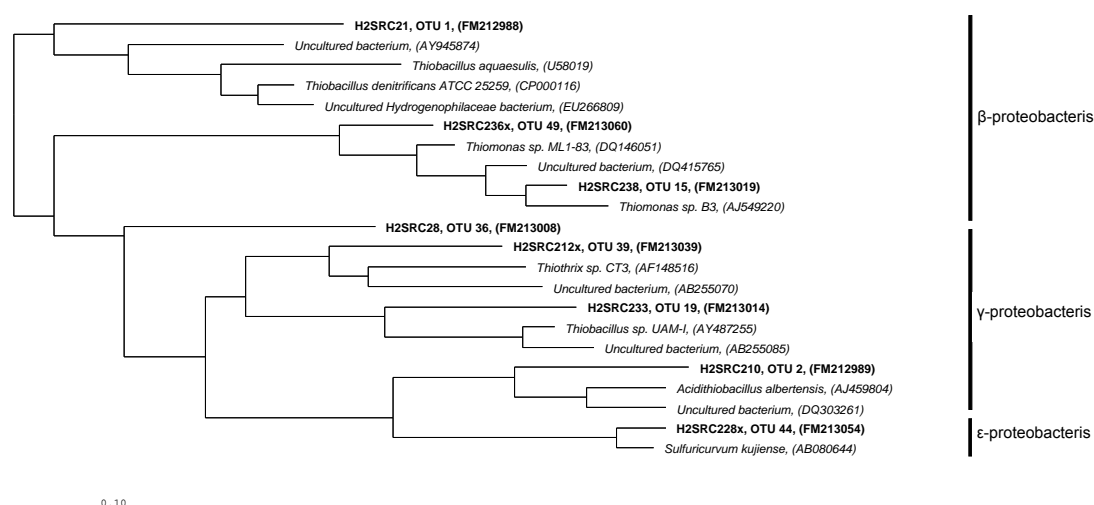
Considerant els canvis significatius entre les dues llibreries de clons construïdes, tant en les abundàncies relatives com en els grups filogenètics identificats, es va observar una profunda transformació de les comunitats al llarg del temps. En aquest sentit al cap de poc més d'un mes d'operació, el grup predominant de la col·lecció C42 va ser el gènere *Thiobacillus* (34% dels clons totals) mentre que *Thiothrix* escassament representava un 1% de la llibreria. En contraposició, al cap de 189 dies d'operació el gènere *Thiothrix* va resultar ser dominant amb un 44% del total dels clons, mentre el gènere *Thiobacillus* disminuïa la seva presència fins al 7% dels clons. De manera similar, la presència de grups minoritaris com *Sulfuricurvum*, *Acidothiobacillus* i *Halothiobacillus* a la primera llibreria, es va reduir notablement en la llibreria C189 com a resultat de la selecció i evolució de les poblacions en el bioreactor.

La capacitat sulfur-oxidant del gènere *Thiobacillus* va ser descrita inicialment per Kelly *et al.* (1997). La majoria de clons afiliats al gènere *Thiobacillus* de la llibreria C42 van mostrar una màxima relació amb clons no cultivables obtinguts d'ambients sulfurosos naturals (Okabe *et al.*, 2007). Tot i així, algunes de les espècies més pròximes als clons obtinguts van ser *Thiobacillus denitrificans* i *Thiobacillus aquaesulis*. Comparativament, a la llibreria C189 no només hi va haver una clara disminució del gènere *Thiobacillus* sinó que, a més, es va observar un canvi substancial d'espècies relacionades com *Thiobacillus denitrificans*, *Thiobacillus sajanensis* i *Thiobacillus plumbophilus*. La predominança del gènere *Thiobacillus* a la llibreria C42 es va relacionar a les condicions de poca càrrega orgànica disponible i a una major abundància relativa en l'inòcul original. Tot i considerar el gènere *Thiobacillus* com un dels principals grups responsables de la sulfur-oxidació en el bioreactor, al cap de 189 dies d'operació van resultar predominants altres espècies

mixòtrofes, com *Thiothrix*, demostrant una millor adaptació a les condicions d'operació.

A partir de la reconstrucció filogenètica realitzada pels diferents OTUS en les bases de dades de l'ARB, es van obtenir dos arbres filogenètics (fig. 3.4), on es pot observar la posició relativa dels diferents clons representatius de cada OTU vers les seqüències gèniques 16S rRNA d'espècies seleccionades del programa ARB.

a)



b)

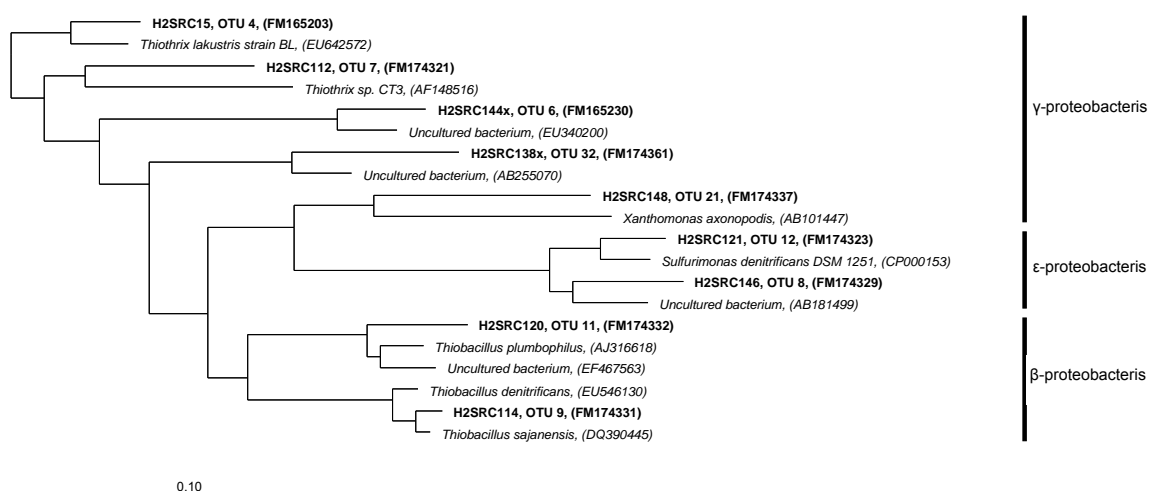


Figura 3.4 Arbres filogenètics de les seqüències gèniques de 16S rRNA de les llibreries de clons generades. a) llibreria de clons C42. b) llibreria de clons C189. En negreta es mostren els clons representatius dels OTUs relacionats amb espècies de bacteris sulfur-oxidants identificats en el biofiltre percolador. La classificació vertical lateral mostra les respectives divisions taxonòmiques de les seqüències representades. Barra d'escala: 10% diferència estimada en la seqüència de nucleòtids.

El gènere *Thiothrix* ha estat descrit en una gran varietat d'ambients, formant part de biofilms de sistemes naturals (Angert *et al.*, 1998; Engel *et al.*, 2001) així com en plantes de tractament d'aigües residuals (Williams i Unz, 1989) on ha estat relacionada com una de les principals causes de formació d'escumes i *bulking* dels fangs. Entre les espècies d'aquest gènere s'hi troben bacteris aeròbics que poden ser heteròtrofs, quimiolitotrofs o mixòtrofs. L'espècie *Thiothrix CT3* va ser relacionada amb un alt grau de similitud amb clons obtinguts en ambdues llibreries. *Thiothrix CT3* és capaç de créixer en presència de compostos reduïts de sofre com a única font d'energia, a més de poder emmagatzemar grans quantitats de polihidroxibutirat en ambients amb carboni orgànic disponible (Majone *et al.*, 2007). No obstant a la llibreria C189, on el gènere *Thiothrix* va resultar predominant, l'espècie *Thiothrix lakustris* va aparèixer com insert majoritari entre els clons d'aquest grup. La predominança de *Thiothrix* a la llibreria de clons C189 es va relacionar amb el possible metabolisme mixòtrof d'aquestes espècies i a la considerable disponibilitat de biomassa acumulada al cos del biofiltre després de 189 dies d'operació. Aquest avantatge metabòlic, així com la forta pressió selectiva pròpia de les condicions ambientals de la operació van causar els canvis poblacionals comentats i la predominança de bacteris *Thiothrix* en detriment d'altres.

De manera minoritària es van identificar alguns clons relacionats amb l'espècie *Sulfuricurvum kujense*, un bacteri quimiolitotrof anaeròbic facultatiu amb capacitat sulfur-oxidant. Tot i així, únicament es va identificar a la llibreria C42, indicant que probablement no es va adaptar a les estrictes condicions operacionals del biofiltre, a diferència de l'espècie *Sulfurimonas denitrificans* que va ser identificada a la llibreria C189. Aquest, també és un bacteri quimiolitotrof anaeròbic facultatiu amb capacitat sulfur-oxidant que probablement juga un paper important en els processos de sulfur-oxidació que es duen a terme en condicions de baixa concentració d'oxigen. En aquest sentit, Okabe *et al.* (2005) va identificar *S. denitrificans* com un dels principals contribuïdors a l'oxidació anaeròbica parcial del H₂S a S⁰ en biofilms microaeròfils d'aigües residuals.

Així doncs, a partir de les dues llibreries de clons construïdes va ser possible caracteritzar filogenèticament les poblacions microbianes existents en dos moments concrets d'operació del biofiltre percolador, oferint dues fotografies estàtiques i comparables de la part biòtica del bioprocés.

3.4.2 SEGUIMENT DE POBLACIONS SULFUR-OXIDANTS PER FISH

En base a la informació de les seqüències 16S rRNA obtingudes de les poblacions identificades en les llibreries genètiques construïdes, es va plantejar un estudi de FISH en una nova posada en marxa del biofiltre amb intenció d'aprofundir en la dinàmica de poblacions i en la quantificació d'espècies sulfur-oxidants al llarg de la operació. Tot i treballar amb una nova posada en marxa del bioreactor, la selecció d'espècies i grups de microorganismes diana a seguir mitjançant FISH es va basar en els resultats de la identificació de les poblacions sulfur-oxidants presentats en l'apartat anterior.

Segons les quantificacions de les poblacions sulfur-oxidants obtingudes dels diferents moments d'operació i zones de mostreig es va poder observar la dinàmica de les espècies sulfur-oxidants de diverses zones del biofiltre i a diferents moments d'operació. Així doncs, es va realitzar un seguiment i quantificació de les espècies sulfur-oxidants, permetent relacionar l'operació del biofiltre amb la composició de les comunitats microbianes desenvolupades.

3.4.2.1 POSADA EN MARXA I OPERACIÓ DEL BIOFILTRE PERCOLADOR

Els nous objectius definits al voltant del seguiment de poblacions sulfur-oxidants al llarg de la posada en marxa i operació del bioreactor van conduir a la modificació del cos del biofiltre per tal de facilitar i permetre el mostreig de biomassa a diferents altures, minimitzant l'impacte en l'operació d'aquest. Una detallada descripció tant de l'estratègia seguida en la posada en marxa com en l'experimentació realitzada a condició d'optimitzar l'operació han estat presentats en el capítol 2 d'aquesta tesi.

Tot i les diferents actuacions implementades al llarg del període, especialment durant els 4 primers mesos d'operació, el biofiltre va demostrar ser un sistema robust i adaptable a petits canvis configuracionals, mantenint una RE>98% pràcticament durant tot el període operacional considerat. Tal i com es pot observar al gràfic de la figura 3.5, el seguiment de l'OD, ORP i pH al llarg dels 350 dies considerats mostren una operació estable del biofiltre malgrat les oscil·lacions periòdiques pròpies de l'operació. L'accident operacional del dia 209, causat per una interrupció en l'aportació d'aire al sistema, va ocasionar una important pertorbació en l'operació del bioreactor. Tot i així, en poc més de tres setmanes el biofiltre va recuperar la seva activitat i valors estacionaris d'operació previs a l'accident.

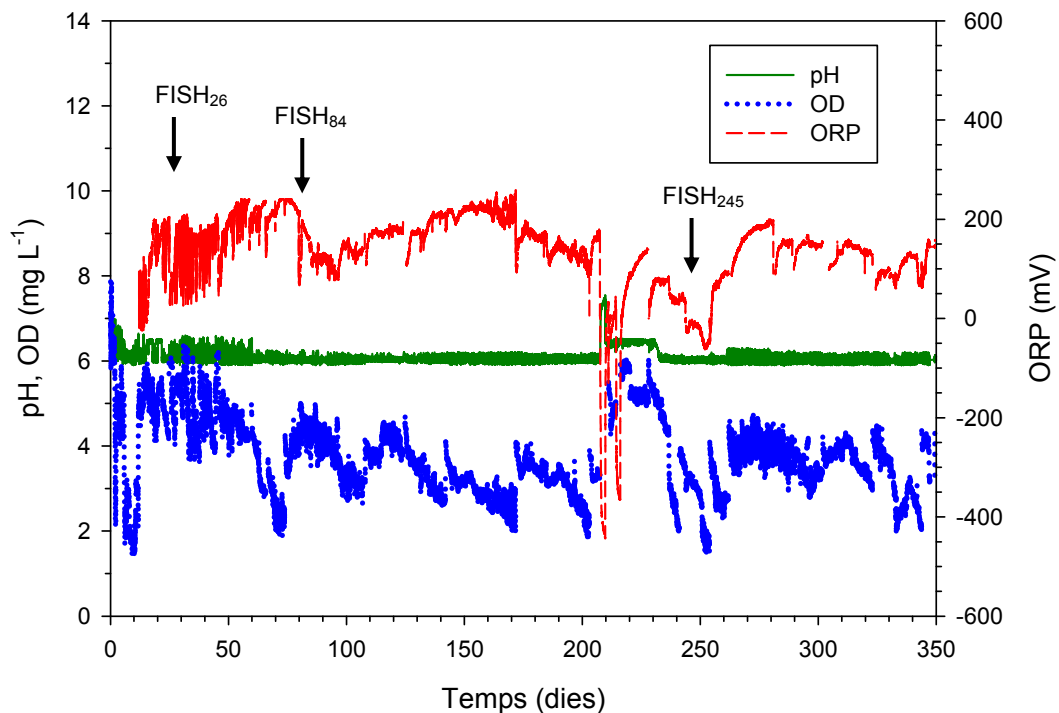


Figura 3.5 Seguiment en línia del pH, potencial d'oxidació-reducció (ORP) i oxigen dissolt (OD) del biofiltre percolador al llarg dels 350 dies d'operació considerats. Les fletxes mostren els mostreigs realitzats per a FISH

A la taula 2.5 del capítol 2 hi ha un recull de les variables operacionals, concentracions iòniques i rendiments d'oxidació de H_2S per a cada un dels estudis de FISH realitzats on es descriuen les condicions ambientals del bioreactor referides a cada mostreig.

3.4.2.2 DETERMINACIÓ DE LA DINÀMICA DE POBLACIONS SULFUR-OXIDANTS MITJANÇANT LA TÈCNICA FISH

Amb intenció d'estudiar més profundament la composició i evolució de les poblacions sulfur-oxidants al llarg de la nova posada en marxa del biofiltre amb un nou material de rebliment, es va utilitzar la tècnica FISH per a diferents grups de microorganismes i espècies sulfur-oxidants, referides a diferents zones i moments d'operació. La quantificació de les espècies i grups de microorganismes estudiats en les diferents mostres va ser expressada en forma de percentatge relatiu de cèl·lules híbrides amb EUB338mix (definides com a bacteris totals). Així doncs, en base el càlcul de les abundàncies relatives de les espècies sulfur-oxidants, es va valorar la dinàmica d'aquestes poblacions tant al llarg de l'operació com en la seva distribució al bioreactor.

D'acord amb els resultats derivats de les dues llibreries de clons construïdes en la operació prèvia del biofiltre no es van utilitzar sondes d'oligonucleòtids específiques per a proteobacteris delta. En aquest sentit, estudis similars al voltant de les comunitats sulfur-oxidants van considerar negligible la quantitat de proteobacteris delta en comparació amb altres classes de proteobacteris (Fernández *et al.*, 2008; Okabe *et al.* 2007). Partint de l'inòcul inicial (dia 0 d'operació), a la fig. 3.6 es poden observar les quantificacions relatives resultants de les sondes d'oligonucleòtids hibridades, així com l'evolució de les comunitats microbianes de mostres preses a tres alçades del reactor al cap de 26 dies d'operació del bioreactor.

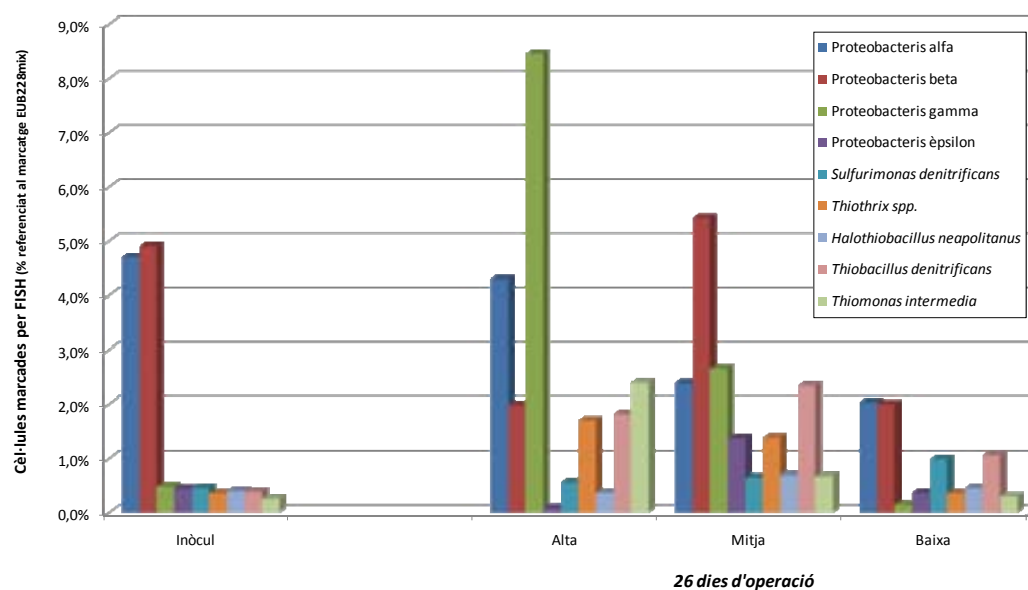


Figura 3.6 Canvis poblacionals dels grups de microorganismes i espècies sulfur-oxidants estudiats per FISH en la posada en marxa del bioreactor. Es diferencien les abundàncies relatives en funció de la distribució al llarg del biofiltre (zona alta, mitja i baixa). Es mostren les quantificacions en termes d'abundància relativa referides a la senyal de la sonda general per a eubacteris (EUB338mix).

Les classes de proteobacteris alfa i beta van resultar dominants en els estudis de FISH realitzats a la biomassa de l'inòcul, representant cada una un 5% de les cèl·lules hibridades amb EUB338mix. Les abundàncies relatives observades de proteobacteris alfa i beta van resultar significativament diferents que les existents en els inòculs analitzats amb anterioritat (Maestre *et al.*, 2008), probablement degut a les diferents característiques de l'inòcul inicial provinent de la planta de tractament d'aigües residuals. La dominància de proteobacteris alfa pot estar relacionada amb la presència d'alguns grups de bacteris filamentosos (no relacionat amb *Thiiothrix*) causants de problemes de *bulking* en les plantes de tractament d'aigües residuals (Levantesi *et al.*, 2004). No obstant, la no utilització de sondes específiques per a espècies de proteobacteris alfa en aquest estudi, no va permetre confirmar aquesta hipòtesi. Per altre costat, la possible presència de microorganismes relacionats amb

els processos de nitrificació com *Nitrosomonas* (proteobacteri beta) i *Nitrobacter* (proteobacteri alfa) podrien reforçar les quantificacions obtingudes en l'inòcul. Respecte les espècies sulfur-oxidants analitzades en l'inòcul, va resultar significatiu que pràcticament cap de les sondes híbrides presentés una presència superior al 1% de les cèl·lules marcades, indicant una molt baixa abundància de les espècies escollides el dia 0 d'operació. En aquest sentit, altres treballs han observat com espècies sulfur-oxidants de *Thiothrix*, escassament representen un 3% dels bacteris totals dels fangs aerobis d'una planta de tractament d'aigües residuals (Nielsen *et al.*, 2000).

Valorant la dinàmica de les poblacions analitzades per FISH al cap de 26 dies d'operació del biofiltre, es va observar una notable variació de les abundàncies relatives de les espècies i grups de microorganismes estudiats, especialment entre les diferents seccions del biofiltre analitzades. Respecte les diferents classes, els proteobacteris alfa no va mostrar pràcticament cap variació a la zona alta del biofiltre al cap de 26 dies d'operació, a diferència de les zones mitja i baixa on va disminuir la seva abundància relativa a la meitat aproximadament. Els proteobacteris beta van mostrar una evolució diferent, apareixent com la classe dominant a la zona mitja del biofiltre i disminuint la seva presència a la meitat a les zones altes i baixes del bioreactor. Un dels canvis més notoris entre les diferents classes de proteobacteris, va ser que els proteobacteris gamma van resultar la classe més abundant a la zona alta del biofiltre, la segona més dominant a la zona mitja i pràcticament no eren presents a la zona baixa del bioreactor. Per últim, els proteobacteris èpsilon pràcticament no va mostrar cap adaptació i evolució significativa respecte l'inòcul inicial, solament a la zona mitja del biofiltre va mostrar un lleuger augment, assolint un 1,4% de les cèl·lules marcades d'aquesta zona. La pròpia configuració del bioreactor i les condicions selectives d'operació van causar una evident adaptació diferencial dels diferents *phyla* al llarg de la posada en marxa del sistema. Segons les quantificacions relatives obtingudes en funció de la zona del biofiltre analitzada al cap de 26 dies d'operació, es van posar en evidència les diferents condicions ambientals existents en les diverses zones analitzades del bioreactor (veure fig. 3.6).

Focalitzant les abundàncies relatives resultants en les espècies de microorganismes sulfur-oxidants analitzades el dia 26 d'operació es va observar un lleuger augment d'aquestes espècies al cos del biofiltre, especialment a la zona alta i mitja del bioreactor. No obstant, les quantificacions relatives obtingudes van resultar inferiors a les esperades, comparativament als estudis d'altres treballs (Maestre *et al.*, 2010). La ràpida posada en marxa del sistema, i l'elevada eficàcia d'eliminació de H₂S assolida al cap de pocs dies d'operació, van demostrar la capacitat sulfur-oxidant del biofiltre.

Tot i així, les quantificacions relatives d'aquestes espècies no van demostrar la predominança de cap de les espècies sulfur-oxidants analitzades en les comunitats bacterianes desenvolupades al cap de 26 dies. Per altre banda, i en base les mateixes quantificacions obtingudes, es va observar una incipient adaptació preferencial d'algunes espècies a determinades zones del bioreactor. Entre les espècies analitzades, *Thiomonas intermedia* va aparèixer com l'espècie sulfur-oxidant més abundant a la zona alta del biofiltre (2.4%), a diferència de les zones mitja i baixa on pràcticament no va mostrar hibridació. De manera similar *Thiobacillus denitrificans* va resultar l'espècie sulfur-oxidant dominant a la zona mitja del biofiltre (2.3%), tot i que també va mostrar certa presència a la zona alta (1.8%) i lleugerament a la zona baixa (1.1%). Pel que fa les espècies de *Thiothrix* al cap de 26 dies d'operació, van presentar una abundància relativa molt minoritària, apareixent únicament a les zones alta i mitja amb un 1.6% i 1.4% de les cèl·lules hibridades, respectivament. Per últim, l'espècie *Sulfurimonas denitrificans* no va aparèixer significativament en cap de les tres zones analitzades, mostrant una quantificació relativa inferior al 1% en totes les zones.

Tot i la tímida adaptació de les poblacions sulfur-oxidants al cap de 26 dies d'operació, a la figura 3.7 es poden observar les quantificacions relatives resultants de les mateixes espècies analitzades en dos mostreigs posteriors, concretament al cap de 84 i 245 d'operació. Les condicions ambientals selectives pròpies de l'operació així com els gradients existents al llarg de la longitud del biofiltre van direccionar la dinàmica de poblacions resultant a les quantificacions observades el dia 84 i posteriorment el dia 245 d'operació. La pròpia configuració del bioreactor ocasionava que les zones baixes del cos del biofiltre fossin unes regions on la relació O₂/H₂S era mínima degut a la proximitat de l'alimentació del corrent gasós (2000 ppm_v H₂S) i a la poca càrrega d'oxigen disponible en la fase líquida. De manera contrària, les zones altes del cos del biofiltre eren unes zones on la relació O₂/H₂S eren màximes, degut a que el sentit de percolació de la fase líquida assegura l'aportació d'oxigen a aquesta altura, a més de ser la regió més allunyada de l'entrada d'aliment (gas) i, per tant, amb menys càrrega disponible de H₂S. Per altre costat, l'acumulació de S⁰ i matèria orgànica observada al llarg del cos del biofiltre podria influenciar les relacions tròfiques de les poblacions presents i, per tant, incidir en la dinàmica de les poblacions observada. Així doncs, segons les consideracions indicades, al llarg del cos del biofiltre concorrien diferents gradients verticals de condicions ambientals, forçats per la pròpia operació en continu del bioreactor. No obstant, cal mencionar que els estudis de FISH realitzats es van elaborar en base a mostreigs representatius de cada una de les zones definides i per tant, les

característiques del biofilm analitzat podien diferir clarament de les consideracions operacionals estimades.

A partir de les quantificacions obtingudes del dia 84, es va observar una notable evolució de les poblacions en les distintes zones del bioreactor, mostrant una marcada predominança de certes espècies en diferents zones del biofiltre. *Halothiobacillus neapolitanus* va aparèixer com l'espècie sulfur-oxidant analitzada més abundant a les zones alta i mitja del biofiltre al cap de 84 dies d'operació, incrementant la seva abundància a un 5.7% i un 14.2% de les cèl·lules híbrdades, respectivament. En canvi a les zones més baixes, *H. neapolitanus*, no va aparèixer en cap anàlisi amb més d'un 1% d'abundància relativa. Per altre costat, un segon grup de poblacions sulfur-oxidants importants al cap de 84 dies d'operació, van ser les espècies de *Thiothrix* amb un 4.6% de les cèl·lules a la zona alta, un 4.0% a la zona mitja i escassament un 1% a la zona baixa. La predominança de *Thiothrix* i *H. neapolitanus* a les zones alta i mitja del bioreactor és relacionable amb el metabolisme aeròbic d'aquests bacteris i a la seva capacitat d'oxidar compostos reduïts de sofre fins a SO₄²⁻ (Okabe *et al.*, 2005).

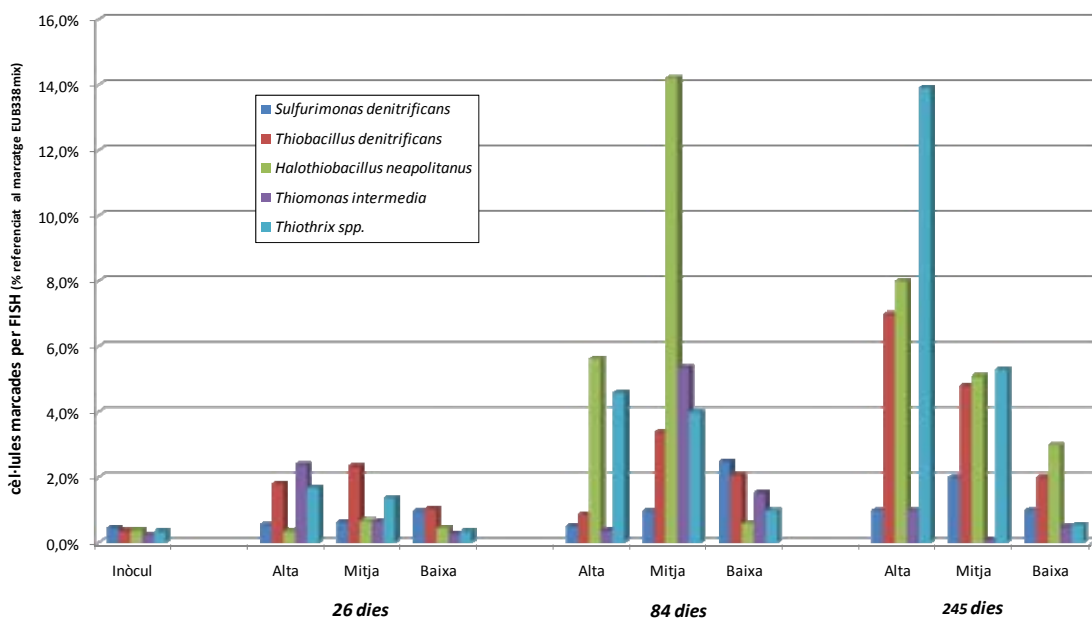


Figura 3.7 Dinàmica poblacional de les espècies sulfur-oxidants estudiades per FISH al llarg del període operacional considerat. Es diferencien les abundàncies relatives de les cèl·lules marcades en funció de la distribució al llarg del biofiltre (zona alta, mitja i baixa). Es mostren les quantificacions en termes d'abundància relativa referides a la senyal de la sonda general per a eubacteris (EUB338mix).

Segons les abundàncies obtingudes de les mostres del dia 84 d'operació, cal destacar, de manera generalitzada, que les espècies sulfur-oxidants amb metabolisme anaeròbic facultatiu com *Sulfurimonas denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans* i *Thiomonas intermedia* van mostrar les majors quantificacions relatives

en zones mitges i baixes del biofiltre, on operacionalment hi ha menys oxigen dissolt disponible. En aquest sentit, *S. denitrificans*, va aparèixer com l'espècie dominant detectada a la zona baixa el biofiltre amb un 2.5% de les cèl·lules, seguida per *T. denitrificans* (2.1%) i *T. intermedia* (1.6%). D'una manera més difosa a la zona mitja del bioreactor, *S.denitrificans* va presentar aproximadament un 1% de la hibridació, mentre *T. denitrificans* representava un 3.4% i *T.intermedia* assolia un 5.4% de la hibridació sent el segon grup predominant d'espècies sulfur-oxidants analitzades per FISH en aquesta zona del biofiltre. Probablement, la mixotròfia metabòlica de *T. intermedia* va resultar un clar avantatge competitiu en la selecció de comunitats microbianes de la zona mitja del bioreactor.

Amb l'objectiu d'analitzar la dinàmica de les poblacions sulfur-oxidants resultants al cap d'un llarg període operacional del biofiltre es van valorar les quantificacions relatives obtingudes al cap de 245 dies d'operació (fig. 3.7). Les ja esmentades condicions ambientals selectives pròpies de l'operació, així com els gradients existents al llarg de la longitud del biofiltre, no van deixar d'incidir en cap moment en forma de pressió selectiva sobre les comunitats bacterianes desenvolupades en el bioreactor. Així doncs, al cap de vuit mesos d'operació es van observar canvis significatius de les espècies estudiades, demostrant una evolució de les comunitats. L'espècie *T. denitrificans*, va incrementar considerablement la seva abundància relativa a la zones alta i mitja del bioreactor, representant un 7.0% i un 4.9% respectivament de cèl·lules hibridades, a diferència de la zona baixa on va mantenir la seva presència de manera similar al dia 84 d'operació. Un dels canvis més significatius, comparativament amb els anteriors resultats de FISH, van ser les quantificacions de l'espècie *H. neapolitanus*, que tot i augmentar sensiblement la seva presència a la zona alta del biofiltre fins al 8.0%, va disminuir notablement l'abundància relativa a la zona mitja, passant de ser l'espècie analitzada més abundant (14.2%) el dia 84, a representar únicament un 5.1% de les cèl·lules hibridades d'aquesta regió al final del mostreig. Sorprenentment a més, va aparèixer com l'espècie més abundant de la zona baixa del biofiltre amb un 3.0% d'hibridació. Cal destacar que l'accident operacional experimentat al voltant del dia 209 d'operació (fig. 3.5), probablement va influir en les comunitats microbianes establertes en el bioreactor i per tant les quantificacions obtingudes del dia 245 poden estar afectades en aquest sentit. Juntament amb l'espècie *H.neapolitanus*, un altre dels canvis més significatius en l'abundància relativa d'aquestes espècies al cap de 245 dies d'operació, van ser les espècies de *Thiothrix* que van aparèixer com els grup de microorganismes sulfur-oxidants més abundants a les zones alta i mitja del biofiltre amb un 13.9% i un 5.4% de les cèl·lules considerades. La pròpia mixotròfia

d'aquestes espècies, juntament amb la conseqüent lisi cel·lular causada per l'accident operacional comentat, poden haver generat un avantatge competitiu d'aquest grup que justificaria la seva gran predominança de en aquestes regions.

Per altre banda, segons les quantificacions relatives als 245 dies d'operació es va observar una disminució general de la quantitat relativa de les espècies *S.denitrificans* i *T. intermedia*. Concretament, l'espècie *T.intermedia*, que apareixia al cap de 84 dies com el segon grup més abundant a la zona mitja del bioreactor, va reduir la seva presència al cap de 245 dies d'operació fins a ser l'espècie menys present en totes les zones del biofiltre. Per altre costat *S.denitrificans*, va passar de ser l'espècie quantificada més abundant de la zona baixa del biofiltre a representar solament un 1% de les cèl·lules híbrides d'aquesta zona. Tot i així, *S.denitrificans* va augmentar tímidament la seva abundància relativa a la zona mitja del reactor representant un 2% de la hibridació al cap de 245 dies d'operació.

A partir dels resultats de FISH obtinguts de les diferents zones i mostreigs realitzats per a les espècies sulfur-oxidants analitzades, es va assolir una cobertura màxima del 31% de les del cèl·lules híbrides. En aquest sentit, la complexitat microbiològica considerada al llarg de l'operació, va resultar parcial tenint en compte el volum de la població no analitzada. No obstant, a partir de les quantificacions calculades es van poder monitoritzar les adaptacions i les dinàmiques de les espècies sulfur-oxidants híbrides, permeten valorar la predominança i distribució d'aquestes espècies en les diferents zones del bioreactor.

3.5 CONCLUSIONS

Considerant les dues aproximacions implementades en l'estudi del marcador filogenètic 16S rRNA, s'ha pogut caracteritzar satisfactòriament la composició microbiològica del biofiltre, a més de monitoritzar la dinàmica poblacional d'espècies sulfur-oxidants en la posada en marxa i operació del bioreactor. El clonatge i seqüenciació dels gens 16S rRNA va permetre identificar en primer terme la diversitat filogenètica existent de les comunitats microbianes desenvolupades en un biofiltre percolador de dessulfuració d'alta càrrega de H₂S. Tot i les desviacions existents associades als passos d'amplificació per PCR i a la metodologia de clonatge, les dues llibreries de clons construïdes van demostrar suficient profunditat de cobertura, catalogant la completa diversitat filogenètica existent referida a dos moments operacionals. Tot i no considerar el clonatge i seqüenciació com a una tècnica

quantitativa, la suficient cobertura de les llibreries construïdes va permetre discutir de forma relativa l'abundància de les diferents poblacions identificades.

A partir de la informació de seqüència derivada de l'estudi de clonatge i seqüenciació realitzat va ser possible identificar i seleccionar les espècies sulfur-oxidants rellevants en el procés de dessulfuració en les condicions d'operació del reactor estudiat. En base a aquesta informació, en una nova posada en marxa del sistema es va realitzar un seguiment d'aquestes poblacions sulfur-oxidants mitjançant la tècnica FISH. Els resultats d'hibridació obtinguts amb la tècnica FISH van ser considerats anàlisis semi-quantitatius, segons els quals es va descriure l'abundància de les diferents poblacions sulfur-oxidants en les distintes zones del bioreactor. A més, es va detectar una dinàmica de poblacions significativament diferent al llarg del temps entre les tres zones considerades. En aquest sentit va ser possible relacionar la predominança d'algunes espècies en determinades zones del bioreactor amb les condicions operacionals del biofiltre. No obstant, el fet d'haver monitorat únicament les espècies sulfur-oxidants identificades en les llibreries de clons prèvies, va limitar la informació disponible resultant en una consideració parcial de les comunitats insuficient per descriure possibles correlacions entre filogènia, funcionalitat, metabolisme i operació del bioreactor. La complexitat i dinàmica de les comunitats microbianes que es desenvolupen en aquests bioprocessos plantegen la necessitat d'estudiar la part microbiològica d'aquests sistemes des d'un punt de vista global. Amb aquesta intenció, el plantejament de noves tècniques i investigacions seran necessàries per aprofundir en el coneixement d'aquests bioprocessos.

Malgrat l'elevat temps de dedicació necessari pel desenvolupament d'aquestes tècniques, tant el clonatge i seqüenciació com la tècnica FISH han demostrat ser unes aproximacions adequades per a l'estudi de les comunitats microbiològiques que es desenvolupen en un bioreactor de dessulfuració d'alta càrrega d'H₂S.

3.6 REFERÈNCIES

- Altschul,S.F., Madden,T.L., Schäffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W., Lipman,D.J., (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research* 25, pp. 3389-3402.
- Amann,R., Fuchs,B.M., Behrens,S., (2001). The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation, *Current Opinion in Biotechnology* 12, pp. 231-236.
- Angert,E.R., Northup,D.E., Reysenbach,A.L., Peek,A.S., Goebel,B.M., Pace,N.R., (1998). Molecular phylogentic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave, Kentucky, *American Mineralogist* 83, pp. 1583-1592.

- Ashelford, K.E., Chuzhanova, N.A., Fry, J.C., Jones, A.J., Weightman, A.J., (2005). At Least 1 in 20 16S rRNA Sequence Records Currently Held in Public Repositories Is Estimated to Contain Substantial Anomalies, *Appl. Environ. Microbiol.* 71, pp. 7724-7736.
- Batey, R.T., Rambo, R.P., Doudna, J.A., (1999). Tertiary Motifs in RNA Structure and Folding, *Angewandte Chemie International Edition* 38, pp. 2326-2343.
- Borin, S., Marzorati, M., Brusetti, L., Zilli, M., Cherif, H., Hassen, A., Converti, A., Sorlini, C., Daffonchio, D., (2006). Microbial Succession in a Compost-packed Biofilter Treating Benzene-contaminated Air, *Biodegradation* 17, pp. 79-89.
- Bosshard, P.P., Stettler, R., Bachofen, R., (2000). Seasonal and spatial community dynamics in the meromictic Lake Cadagno, *Archives of Microbiology* 174, pp. 168-174.
- Casamayor, E.O., Núñez-Cardona, M.T., Calderón-Paz, J.I., Mas, J., Pedrós-Alió, C., (2000). Comparison of pure cultures and natural assemblages of planktonic photosynthetic sulfur bacteria by low molecular mass RNA fingerprinting, *FEMS Microbiology Ecology* 32, pp. 25-34.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis, *Nucleic Acids Research* 37, p. D141-D145.
- Cytryn, E., Minz, D., Gieseke, A., and Rijn, J. (2006) Transient development of filamentous *Thiothrix* species in a marine sulfide oxidizing, denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Letters* 256: 22-29.
- Deviny, J. S., Deshusses, M. A., Webster, T. S. (1999) Biofiltration for Air Pollution Control. CRC-Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA.
- Elshahed, M.S., Senko, J.M., Najjar, F.Z., Kenton, S.M., Roe, B.A., Dewers, T.A., Spear, J.R., Krumholz, L.R., (2003). Bacterial Diversity and Sulfur Cycling in a Mesophilic Sulfide-Rich Spring, *Appl. Environ. Microbiol.* 69, pp. 5609-5621.
- Engel, A.S., Porter, M.L., Kinkle, B.K., Kane, T.C. (2001). Ecological Assessment and Geological Significance of Microbial Communities from Cesspool Cave, Virginia. *Geomicrobiology Journal* 18[3], 259-274.
- Engel, A.S., Porter, M.L., Stern, L.A., Quinlan, S., Bennett, P.C., (2004). Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic *Epsilonproteobacteria*, *FEMS Microbiology Ecology* 51, pp. 31-53.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P. (1998): Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8(3):175-185
- Fernández, N., Sierra-Alvarez, R., Field, J.A., Amils, R., Sanz, J.L., (2008). Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge, *Chemosphere* 70, pp. 462-474.
- Fortuny, M., Baeza, J.A., Gamisans, X., Casas, C., Lafuente, J., Deshusses, M.A., Gabriel, D., (2008). Biological sweetening of energy gases mimics in biotrickling filters, *Chemosphere* 71, pp. 10-17.
- Fortuny, M., Gamisans, X., Deshusses, M.A., Lafuente, J., Casas, C., Gabriel, D., (2011). Operational aspects of the desulfurization process of energy gases mimics in biotrickling filters, *Water Research* 45, pp. 5665-5674.
- Friedrich, C.G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A., Fischer, J., (2001). Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism?, *Appl. Environ. Microbiol.* 67, pp. 2873-2882.
- Friedrich, C.G., Bardischewsky, F., Rother, D., Quentmeier, A., Fischer, J., (2005). Prokaryotic sulfur oxidation, *Current Opinion in Microbiology* 8, pp. 253-259.

- Friedrich,U., Prior,K., Altendorf,K., Lipski,A., (2002). High bacterial diversity of a waste gas-degrading community in an industrial biofilter as shown by a 16S rDNA clone library, *Environmental Microbiology* 4, pp. 721-734.
- Gabriel,D., Deshusses,M.A., (2003). Performance of a full-scale biotrickling filter treating H₂S at a gas contact time of 1.6 to 2.2 seconds, *Environ. Prog.* 22, pp. 111-118.
- Glasel,J., (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* 18 (1): 62–63.
- Gregory,S.P., Shields,R.J., Fletcher,D.J., Gatland,P., Dyson,P.J., (2010). Bacterial community responses to increasing ammonia concentrations in model recirculating vertical flow saline biofilters, *Ecological Engineering* 36, pp. 1485-1491.
- Hallberg, K.B., Coupland, K., Kimura, S., and Johnson, D.B. (2006) Macroscopic streamer growths in acidic, metal-rich mine waters in North Wales consist of novel and remarkably simple bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2022–2030.
- Hansel,C.M., Fendorf,S., Jardine,P.M., Francis,C.A., (2008). Changes in Bacterial and Archaeal Community Structure and Functional Diversity along a Geochemically Variable Soil Profile, *Appl. Environ. Microbiol.* 74, pp. 1620-1633.
- Head,I.M., Saunders,J.R., Pickup,R.W., (1998). Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms, *Microbial Ecology* 35, pp. 1-21.
- Ho,K.L., Chung,Y.C., Lin,Y.H., Tseng,C.P., (2008). Microbial populations analysis and field application of biofilter for the removal of volatile-sulfur compounds from swine wastewater treatment system, *Journal of Hazardous Materials* 152, pp. 580-588.
- Huang,X., Madan,A., (1999). CAP3: A DNA Sequence Assembly Program, *Genome Research* 9, pp. 868-877.
- Huber,T., Faulkner,G., Hugenholtz,P., (2004). Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments, *Bioinformatics* 20, pp. 2317-2319.
- Hugenholtz P., Tyson G.W., and Blackall LL. (2001) Design and evaluation of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization. In *Methods in Molecular Biology, Gene Probes: Principles and Protocols*. Aquino de Muro,M.R. (ed). Humana, pp. 29-42.
- Jubany,I., Lafuente,J., Carrera,J., Baeza,J.A., (2009). Automated thresholding method (ATM) for biomass fraction determination using FISH and confocal microscopy, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, pp. 1140-1145.
- Keitz,V., Schramm,A., Altendorf,K., Lipski,A., (1999). Characterization of Microbial Communities of Biofilters by Phospholipid Fatty Acid Analysis and rRNA Targeted Oligonucleotide Probes, *Systematic and Applied Microbiology* 22, pp. 626-634.
- Kennes, C., Veiga, M. C., (2001) *Bioreactors for Waste Gas Treatment*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Kelly,D.P., Shergill,J.K., Lu,W.P., Wood,A.P., (1997). Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek* 71, pp. 95-107.
- Kim,S., Deshusses,M.A., (2005). Understanding the limits of H₂S degrading biotrickling filters using a differential biotrickling filter, *Chemical Engineering Journal* 113, pp. 119-126.
- Kobabe,S., Wagner,D., Pfeiffer,E.M., (2004). Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence in situ hybridisation, *FEMS Microbiology Ecology* 50, pp. 13-23.
- Levantesi,C., Beimfohr,C., Geurkink,B., Rossetti,S., Thelen,K., Krooneman,J., Snaidr,J., van der Waarde,J., Tandoi,V., (2004). Filamentous Alphaproteobacteria Associated with Bulking in Industrial Wastewater Treatment Plants, *Systematic and Applied Microbiology* 27, pp. 716-727.

- Loy, A., Horn, M., Wagner, M., (2003). probeBase: an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes, *Nucleic Acids Research* 31, pp. 514-516.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüssmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K., (2004). ARB: a software environment for sequence data, *Nucleic Acids Research* 32, pp. 1363-1371.
- Macalady JL, Lyon EH, Koffman B, Albertson LK, Meyer K, Galdenzi S *et al.* (2006). Dominant microbial populations in limestone-corroding stream biofilms, Frasassi cave system, Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5596–5609.
- Maestre, J.P., Rovira, R., Gamisans, X., Kinney, K.A., Kirisits, M.J., Lafuente, J., Gabriel, D. (2009) Characterization of the bacterial community in a biotrickling filter treating high loads of H₂S by molecular biology tools. *Water Science & Technology* 59.7:1331-1337
- Maestre, J.P., Rovira, R., Álvarez-Hornos, F.J., Fortuny, M., Lafuente, J., Gamisans, X., Gabriel, D. (2010) Bacterial community analysis of a gas-phase biotrickling filter for biogas mimics desulfurization through the rRNA approach. *Chemosphere* 80: 872-880
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker Jr, C.T., Saxman, P.R., Stredwick, J.M., Garrity, G.M., Li, B., Olsen, G.J., Pramanik, S., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M., (2000). The RDP (Ribosomal Database Project) continues, *Nucleic Acids Research* 28, pp. 173-174.
- Majone, M., Beccari, M., Dionisi, D., Levantesi, C., Ramadori, R., Tandoi, V., (2007). Effect of periodic feeding on substrate uptake and storage rates by a pure culture of *Thiothrix* (CT3 strain), *Water Research* 41, pp. 177-187.
- Malhautier, L., Gracian, C., Roux, J.C., Fanlo, J.L., Le Cloirec, P., (2003). Biological treatment process of air loaded with an ammonia and hydrogen sulfide mixture, *Chemosphere* 50, pp. 145-153.
- Manz W., Amann R., Ludwig W., and Wagner M. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *proteobacteria*: problems and solutions. *Systematic and applied microbiology* 15: 593-600.
- Moller, S., Pedersen, A.R., Poulsen, L.K., Arvin, E., Molin, S., (1996). Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy, *Appl. Environ. Microbiol.* 62, pp. 4632-4640.
- Montebello, A.M., Baeza, M., Lafuente, J., Gabriel, D., (2010). Monitoring and performance of a desulfurizing biotrickling filter with an integrated continuous gas/liquid flow analyser, *Chemical Engineering Journal* 165, pp. 500-507.
- Nelson, D., Ohene-Adjei, S., Hu, F., Cann, I., Mackie, R., (2007). Bacterial Diversity and Distribution in the Holocene Sediments of a Northern Temperate Lake, *Microbial Ecology* 54, pp. 252-263.
- Nielsen, P.H., De Muro, M.A., Nielsen, J.L., (2000). Studies on the in situ physiology of *Thiothrix* spp. present in activated sludge, *Environmental Microbiology* 2, pp. 389-398.
- Okabe, S., Ito, T., Sugita, K., Satoh, H., (2005). Succession of Internal Sulfur Cycles and Sulfur-Oxidizing Bacterial Communities in Microaerophilic Wastewater Biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.* 71, pp. 2520-2529.
- Okabe, S., Odagiri, M., Ito, T., Satoh, H., (2007). Succession of Sulfur-Oxidizing Bacteria in the Microbial Community on Corroding Concrete in Sewer Systems, *Appl. Environ. Microbiol.* 73, pp. 971-980.
- Pfenning, N., Widdel, F., Trüper, H. G. (1981) The dissimilatory sulfate-reducing bacteria. In: *The Prokaryotes*, Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, A., Schlegel, H. G., Springer Verlag, NY, USA, (1), 926-940.

- Pruesse,E., Quast,C., Knittel,K., Fuchs,B.M., Ludwig,W., Peplies,J., Glöckner,F.O., (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB, *Nucleic Acids Research* 35, pp. 7188-7196.
- Ravenschlag,K., Sahm,K., Pernthaler,J., Amann,R., (1999). High Bacterial Diversity in Permanently Cold Marine Sediments, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, pp. 3982-3989.
- Robertson,L., Kuenen,J., (2006). The Colorless Sulfur Bacteria. *The Prokaryotes*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt (Eds.). pp. 985-1011.
- Roy,S., Gendron,J., Delhoménie,M.C., Bibeau,L., Heitz,M., Brzezinski,R., (2003). *Pseudomonas putida* as the dominant toluene-degrading bacterial species during air decontamination by biofiltration, *Applied Microbiology and Biotechnology* 61, pp. 366-373.
- Sakano,Y., Kerkhof,L., (1998). Assessment of Changes in Microbial Community Structure during Operation of an Ammonia Biofilter with Molecular Tools, *Appl. Environ. Microbiol.* 64, pp. 4877-4882.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989) Molecular cloning. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sattley,W.M., Madigan,M.T., (2006). Isolation, Characterization, and Ecology of Cold-Active, Chemolithotrophic, Sulfur-Oxidizing Bacteria from Perennially Ice-Covered Lake Fryxell, Antarctica, *Appl. Environ. Microbiol.* 72, pp. 5562-5568.
- Schlegel,H., Jannasch,H., (2006). Prokaryotes and Their Habitats. *The Prokaryotes*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt (Eds.). Springer New York, pp. 137-184.
- Schloss,P.D., and Handelsman,J. (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1501-1506.
- Sercu,B., Boon,N., Verstraete,W., Van Langenhove,H., (2006). H₂S degradation is reflected by both the activity and composition of the microbial community in a compost biofilter, *Applied Microbiology and Biotechnology* 72, pp. 1090-1098.
- Sheridan,B.A., Curran,T.P., Dodd,V.A., (2003). Biofiltration of n-butyric acid for the control of odour, *Bioresource Technology* 89, pp. 199-205.
- Snaird,J., Amann,R., Huber,I., Ludwig,W., Schleifer,K.H., (1997). Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge, *Appl. Environ. Microbiol.* 63, pp. 2884-2896.
- Sorokin,D.Y., Tourova,T.P., Lysenko,A.M., Muyzer,G., (2006). Diversity of culturable halophilic sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline habitats, *Microbiology* 152, pp. 3013-3023.
- Takai,K., Oida,H., Suzuki,Y., Hirayama,H., Nakagawa,S., Nunoura,T. (2004) Spatial Distribution of Marine Crenarchaeota Group I in the Vicinity of Deep-Sea Hydrothermal Systems. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 2404-2413.
- Talbot,G., Topp,E., Palin,M.F., Massé ,D.I., (2008). Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors, *Water Research* 42, pp. 513-537.
- Taylor,C.D., Wirsén,C.O., Gaill,F., (1999). Rapid Microbial Production of Filamentous Sulfur Mats at Hydrothermal Vents, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, pp. 2253-2255.
- Van der Wielen,P.W.J.J., Bolhuis,H., Borin,S., Daffonchio,D., Corselli,C., Giuliano,L., D'Auria,G., de Lange,G.J., Huebner,A., Varnavas,S.P., Thomson,J., Tamburini,C., Marty,D., McGenity,T.J., Timmis,K.N., BioDeep,S.P., (2005). The Enigma of Prokaryotic Life in Deep Hypersaline Anoxic Basins, *Science* 307, pp. 121-123.
- Wagner,M., Amann,R., Lemmer,H., Schleifer,K.H., (1993). Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure, *Appl. Environ. Microbiol.* 59, pp. 1520-1525.

Williams, T.M., Unz, R.F., (1989). The nutrition of *Thiothrix*, type 021N, *Beggiatoa* and *Leucothrix* strains, *Water Research* 23, pp. 15-22.

**CAPÍTOL 4. DESENVOLUPAMENT METODOLÒGIC PER A
L'ESTUDI DEL METATRANSCRIPTOMA D'UN BIOFILTRE
PERCOLADOR DE DESSULFURACIÓ D'ALTA CÀRREGA D'H₂S**

4.1 INTRODUCCIÓ

La metatranscriptòmica, és a dir, la seqüenciació massiva del RNA missatger (mRNA) d'una mostra ambiental, proporciona una visió descriptiva i objectiva de la funcionalitat de la comunitat microbiològica present mitjançant la determinació quantitativa dels gens que s'estan expressant en el moment que es pren la mostra. Aquesta tècnica com altres òmiques, no restringeix l'anàlisi a cap grup filogenètic específic ni a cap ruta metabòlica predefinida sinó que analitza la mostra de manera global (Poretsky *et al.*, 2005). Els treballs de metatranscriptòmica descrits fins al moment s'han centrat al voltant d'estudis ambientals tant en ecosistemes terrestres (Leininger *et al.*, 2006; Urich *et al.*, 2008) com aquàtics (Gilbert *et al.*, 2008; Frias-López *et al.*, 2008) permetent, per exemple, l'estudi dels patrons d'expressió gènica bacteriana sota la influència del CO₂ (Poretsky *et al.*, 2009), o l'estudi de comunitats bacterianes marines relacionades amb la generació de dimetilsulfur (DMS), els productes d'oxidació del qual s'han relacionat amb el refredament del planeta (Vila-Costa *et al.*, 2010). Fins i tot existeixen treballs, que consideren la metatranscriptòmica com una potent eina per al descobriment de nous biocatalitzadors per a possibles nous processos biotecnològics (Warnecke i Hess, 2009).

Recentment, les noves perspectives d'aplicació d'aquesta tècnica a d'altres àmbits ha estès l'ús del terme metatranscriptòmica a altres disciplines. Referint-se conceptualment, de forma general, a l'estudi dels gens que s'estan expressant en una comunitat microbiològica complexa segons unes condicions ambientals donades. Sota aquest concepte, apareixen nous treballs de metatranscriptòmica en altres camps com poden ser la biomedicina (Booijink *et al.*, 2010; Gosalbes *et al.*, 2011;), la biotecnologia alimentària (Nam *et al.*, 2009; Weckx *et al.*, 2011) i la recerca de biocombustibles renovables (Tartar *et al.*, 2009). El treball d'aquest capítol, així com el del següent, és un nou exemple d'aplicació de la metatranscriptòmica a noves disciplines. Concretament al camp de la biotecnologia ambiental en un procés de biofiltració d'alta càrrega d'H₂S.

A continuació es presenten i es discuteixen els aspectes metodològics definits i optimitzats al voltant de l'obtenció del metatranscriptoma del biofiltre percolador. Aspectes metodològics influenciats i condicionats tant per les característiques de la mostra com per la plataforma de seqüenciació massiva escollida. A la figura 4.1 es presenta, de manera esquemàtica, el procediment seguit per a la realització d'un estudi metatranscriptòmic.

En aquest treball, entre les diverses tecnologies de seqüenciació disponibles, es va escollir la plataforma de piroseqüenciació de Roche 454 GS-FLX Titanium (Branford, CT, EEUU) ja que segons les descripcions tècniques, es presenta com a la tecnologia de seqüenciació massiva que permet l'obtenció de lectures de major mida (de fins a ≈500 pb) conjuntament amb una suficient cobertura de seqüenciació (400-600 milions de pb per reacció de seqüenciació). Aquesta és la plataforma de seqüenciació més utilitzada per a seqüenciacions *de novo* (Kumar i Blaxter, 2010; Der *et al.*, 2011; Logacheva *et al.*, 2011; Gregory *et al.*, 2011). És evident que l'elecció del mètode de seqüenciació condiciona aspectes metodològics anteriors a l'etapa de seqüenciació, especialment en l'etapa de preparació del cDNA. On a partir de la mostra de RNA cal assolir les especificacions requerides per la plataforma de seqüenciació escollida.

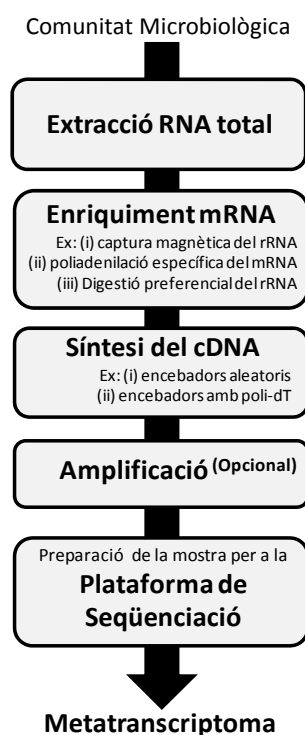


Figura 4.1. Esquema del procediment metodològic per a l'obtenció del metatranscriptoma d'una comunitat microbiana mitjançant una tècnica de seqüenciació massiva. En casos concrets amb baixos rendiments de mRNA, opcionalment es pot realitzar una etapa d'amplificació prèvia a la seqüenciació.

Pels estudis de metatranscriptòmica és essencial l'enriquiment del mRNA de la mostra. La gran abundància de rRNA en les comunitats bacterianes i el fet que aquest s'extrau conjuntament amb el mRNA fa necessari una sèrie de passos d'enriquiment previs a la obtenció del cDNA. Un cop eliminada la màxima quantitat

possible de rRNA es procedeix per retrotranscripció a l'obtenció del cDNA, en la que, idealment, cada mRNA genera una còpia de cDNA que serà posteriorment seqüenciada. A més, les característiques de la retrotranscripció permeten a priori mantenir les proporcions de mRNA presents a la mostra, fent que aquests estudis puguin ser no només qualitatiu sinó també quantitatiu.

El processament de la mostra per a l'estudi metatranscriptòmic, que es resumeix fàcilment en tres passos, és un procés delicat i complex degut a diferents aspectes associats a les característiques de la mostra que s'està manipulant. Així cal tenir en compte la curta vida mitja que presenten molts mRNA procariotes i l'elevada quantitat de RNAses (enzims que degraden RNA) existents tant en l'entorn com en el interior de les cèl·lules (Farrel, 2009). Això comporta que els estudis associats a mRNA estiguin críticament condicionats pel temps que transcorre des del mostreig fins al processament de la mostra. Existeixen diferents tractaments que permeten "congelar" la mostra un cop presa per evitar la degradació de RNA abans del procediment (nitrogen líquid, RNA/later®), però els procediments més efectius passen per realitzar, sempre que sigui possible, la lisi immediata de les cèl·lules i la posterior purificació del RNA total immediatament després del moment del mostreig.

Les característiques de la mostra biològica inicial poden influir també en el rendiment de les etapes d'extracció i purificació així com en la qualitat del mRNA obtingut. Existeixen diferents mètodes publicats per a l'extracció i purificació de RNA a partir de mostres de sòls (Fleming *et al.*, 1998; Sessitsch *et al.*, 2002). En el treball concret d'aquesta tesi, la gran quantitat de sofre inorgànic homogèniament present en la mostra biològica ha dificultat i condicionat la metodologia inicialment plantejada per a l'obtenció de mRNA. Diferents protocols i mètodes comercials han estat testats per assolir les quantitats i qualitats de mRNA mínimes necessàries pel processament de la mostra i la seva aplicació en les tècniques de seqüenciació massiva aplicades en els estudis metatranscriptòmics que es plantegen.

Els procediments que seguidament es presenten permeten obtenir els transcriptomes que descriuen la realitat metabòlica dels microorganismes presents en un bioprocés industrial i revelen, als estudis metatranscriptòmics, com una nova eina de coneixement del procés que s'està desenvolupant en aquest escenari tan extrem i selectiu.

4.2 ANTECEDENTS

Els estudis previs desenvolupats al voltant de la biologia del biofiltre percolador tractant altes càrregues de H₂S han estat enfocats sempre en l'estudi de la composició de les comunitats microbianes que es desenvolupen en el bioreactor (Maestre *et al.*, 2009; 2010). La implementació de tècniques de biologia molecular ha permès identificar les principals poblacions que colonitzen el reactor i caracteritzar-les de manera rutinària, demostrant ser una potent eina complementària en l'estudi del bioprocés. El clonatge i seqüenciació dels gens 16S rRNA, així com la tècnica FISH han estat presentats prèviament en el capítol 3 d'aquesta memòria de tesi, com a mètodes idonis per a avaluar la composició i l'evolució temporal d'espècies en el biofiltre. Tot i així, aquests treballs resulten insuficients per a descriure les complexes relacions entre els microorganismes i els processos que tenen lloc en el bioreactor. En aquest sentit, per a ser capaços de descriure la relació filogènia-funcionalitat del bioprocés és necessària la complementació d'aquests estudis amb treballs d'expressió gènica.

La divergència evolutiva dels metabolismes sulfur-oxidants existents, causen una major complexitat a l'hora de plantejar estudis concrets d'expressió gènica. Per això una aproximació ideal en l'avaluació de l'activitat global de les comunitats microbiològiques complexes és la metatranscriptòmica. Fins al moment, no existeixen referències d'estudis metatranscriptòmics al voltant d'ambients sulfurosos, de la mateixa manera que tampoc n'existeixen al voltant d'un bioprocés ambiental. Així doncs, amb el desenvolupament metodològic per a l'obtenció del metatranscriptoma del biofiltre percolador tractant altes càrregues de H₂S, serà possible descriure l'activitat metabòlica global del procés, generant una gran quantitat d'informació biològica específica d'ambients sulfurosos.

4.3 OBJECTIUS

Amb la motivació final de presentar una anàlisi global dels gens que s'estan expressant en les comunitats microbiològiques presents en el bioreactor, es planteja i es desenvolupa una metodologia experimental per a poder realitzar un estudi metatranscriptòmic del biofiltre percolador tractant altes càrregues de H₂S. Els requeriments quantitius i qualitius de mRNA necessaris per a la construcció de la llibreria de cDNA a piroseqüenciar, ha estat una de les forces impulsores en el desenvolupament de la metodologia.

4.4 MATERIALS I MÈTODES

4.4.1 MUNTATGE EXPERIMENTAL

El desenvolupament metodològic per a l'estudi metatranscriptòmic que es presenta es du a terme en el mateix bioreactor experimental descrit en el capítol dos d'aquesta tesi. El biofiltre percolador va estar operant ininterrompudament des de la posada en marxa, amb una concentració d'entrada de H₂S de 2.000 ppm_v (55,6 g H₂S m⁻³h⁻¹) mantenint una eficàcia d'eliminació superior al 95% durant tot el període. El cos del biofiltre va ser empaquetat amb un llit desordenat format per anelles Pall de 10 mm diàmetre d'acer inoxidable. Una detallada descripció tant de la configuració del bioreactor com de l'operació del biofiltre poden trobar-se en l'apartat 2.

Les característiques de la biomassa provinent del biofiltre percolador van plantejar d'entrada la necessitat de provar diferents procediments tant d'extracció de RNA total com de purificació del mRNA de la mostra. Aquesta experimentació va ser possible en base a la disponibilitat de biomassa provinent de les diferents seccions del cos del bioreactor.

4.4.2 MOSTREIGS DE BIOMASSA

Prèviament al mostreig definitiu del qual s'ha generat el metatranscriptoma, el biofiltre percolador va estar operant contínuament i de forma estable, permeten reiterats mostreigs a diferents altures per tal de desenvolupar i optimitzar la metodologia que es presenta. El biofilm desenvolupat sobre el material del rebliment era fàcilment apreciable a totes les altures. Cada una de les seccions del cos del bioreactor permetia obtenir biomassa de tres zones diferents: de la zona alta, situada a 40 cm de l'entrada del gas a tractar; de la zona mitja, a 23 cm; i de la zona baixa, a 4 cm; d'una longitud total de 53 cm. D'aquesta manera els mostrejors van ser referits a cada una d'aquestes zones en funció del seu origen. La biomassa provinent de cada un dels punts de mostreig va ser processada de manera independent, duent a terme totes les experimentacions per duplicat. Posteriorment a cada un dels mostreigs realitzats, les mostres de biomassa van ser refrigerades i processades immediatament per tal de minimitzar l'alteració i degradació de la biomassa. Cada mostra va ser dissolta en tampó 1xPBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄) i sedimentada en tubs de centrífuga Falcon de 50 mL. Els sobrenedants de les mostres van ser descartats i els pèl·lets processats segons el procediment d'extracció. Les grans quantitats de S⁰ presents en les mostres

extretes del bioreactor, especialment en la biomassa de la zona baixa del biofiltre, clarament limitaven el rendiment i la qualitat de les extraccions de RNA. Per aquest motiu va ser necessari provar diferents protocols i mètodes comercials amb l'objectiu d'optimitzar el rendiment d'obtenció de RNA.

Les tres mostres de biomassa definitives amb les qual s'ha seguit la metodologia completa per a l'obtenció del metatranscriptoma van ser mostrejades al cap de 350 dies de la posada en marxa de la planta.

4.4.3 EXTRACCIÓ DE RNA TOTAL

Els requeriments de RNA definits per la plataforma de piroseqüenciació de Roche&454 en la construcció d'una llibreria de cDNA, van ser l'objectiu a assolir partint d'una mostra real del biofiltre. Les difícils característiques de la mostra, juntament amb els requeriments quantitatius i qualitius de RNA, van fer de l'etapa d'extracció un pas crític a optimitzar. Aquest fet va conduir, d'entrada, a maximitzar les quantitats de RNA total que s'extreien de les mostres del bioreactor. Les experimentacions en aquest sentit es van centrar al voltant de set procediments comercials diferents: El *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche), el *SV Total RNA Isolation System* (Promega), el *RiboPure™-Bacteria* (Ambion), la *TRI Reagent® Solution* (Ambion), el *RNeasy®Protect Bacteria Kit* (Qiagen), el *PowerBiofilm™ RNA Isolation Kit* (MoBio) i el *RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit* (Mobio). Cada un dels procediments d'extracció implementats es van dur a terme seguint les descripcions del fabricant. Tots els procediments es van realitzar amb equipaments i materials lliures de nucleases. De la mateixa manera, totes les superfícies de treball van ser netejades amb solució descontaminant de RNases (RNaseZap®, Ambion). En tota la metodologia posterior que es presenta es van prendre les precaucions metodològiques recomanables pròpies de la manipulació de RNA.

4.4.4 TRACTAMENT AMB DNASA I PURIFICACIÓ DEL MRNA

Posteriorment a les extraccions de RNA total de cada una de les mostres es van realitzar diferents incubacions amb DNasa (TURBO DNA-free™ Kit, Ambion) per tal d'eliminar possibles traces de DNA a la mostra. Arribats a aquesta etapa del procediment, les mostres van ser aliquidades i conservades a -20°C, generant un estoc de RNA per a cada una de les zones del biofiltre percolador. Continuant amb el desenvolupament de la metodologia per a l'obtenció de l'anàlisi metatranscriptòmic es van realitzar varies etapes de purificació del mRNA. La primera d'elles va consistir en l'eliminació de les molècules de 16S i 23S del RNA ribosomal, mitjançant la captura magnètica de les molècules de rRNA híbrides específicament. Es van

realitzar dos cicles de sostracció per hibridació per a cada mostra mitjançant el Kit MICROBExpress™ (Ambion). Cada reacció d'enriquiment de mRNA va ser ajustada en funció al volum i concentració de RNA d'entrada de la mostra de manera que cada alíquota va ser processada en múltiples reaccions d'enriquiment.

Les mostres de mRNA resultants d'aquestes etapes d'enriquiment es van sotmetre a un segon tractament de purificació amb el Kit MEGAclean™ (Ambion), per tal d'eliminar totes aquelles petites molècules de RNA (com són els tRNAs i les molècules de 5S rRNA) no capturades en el procés anterior d'enriquiment. Les mostres resultants de mRNA purificades van ser alíquotades i conservades a -20°C per tal d'optimitzar el procés d'obtenció de la llibreria de cDNA.

4.4.5 PREPARACIÓ DE LA LLIBRERIA DE CDNA

El mètode de preparació de la llibreria de cDNA va ser una adaptació segons les descripcions metodològiques del manual de Roche&454 "*cDNA Rapid Library Preparation Method Manual*" per a la plataforma *GS FLX Titanium Series* (Octubre 2009). Cada un dels procediments definits pel manual va ser provat amb l'objectiu d'optimitzar la metodologia definitiva per a la preparació de les llibreries de cDNA. A la figura 4.2 es mostren els procediments estandarditzats del manual sobre els quals es va treballar.

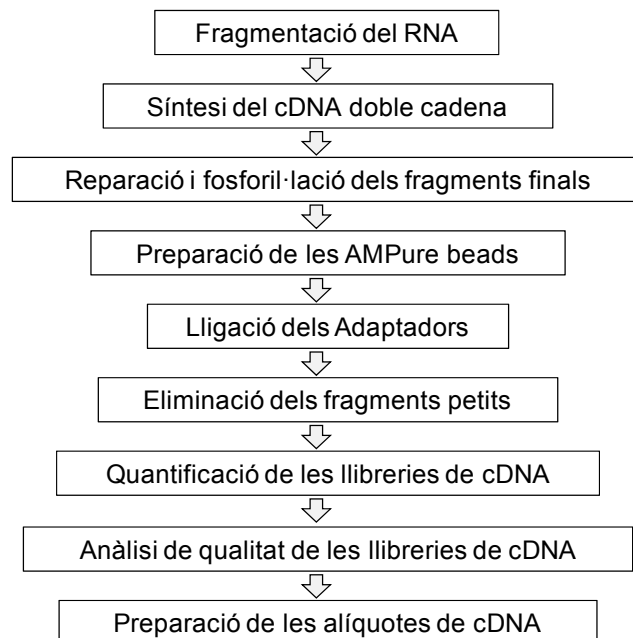


Figura 4.2 Procés de preparació de la llibreria de cDNA segons el *cDNA Rapid Library Preparation Method Manual* per a la plataforma *GS FLX Titanium Series* (Octubre 2009).

Els requeriments de RNA inicial descrits en la metodologia definida pel manual de Roche&454, consistien en un volum màxim de mostra de 19 µL, amb una puresa

mínima de $A_{260/280} \geq 1.8$ i una quantitat mínima de RNA de 200 ng. Partint d'aquestes característiques, es van seguir els procediments descrits en el manual per a generar les genoteques de cDNA, i de la mateixa manera preparar les mostres per a la plataforma de seqüenciació. Les 3 mostres de mRNA provinents del biofiltre van ser processades per separat, generant 3 llibreries de cDNA independents.

Els diferents processos realitzats es poden englobar en dos tipologies metodològiques: per un costat, la generació de les llibreries de cDNA i, per altre, la preparació i adequació de les mostres a la plataforma de seqüenciació. Dins els procediments enfocats a la generació de les llibreries de cDNA, el primer procediment implementat va ser la fragmentació del RNA. La fragmentació de la mostra es va realitzar per mètodes termoquímics amb l'objectiu de normalitzar les longituds dels mRNAs. Cada 19 μ L de mostra (200 ng de mRNA) va ser incubada durant 30 segons a 70°C amb 2 μ L de solució de fragmentació (veure taula 4.5.3.1). Immediatament després de la fragmentació, les mostres van ser refrigerades en gel i tamponades amb 2 μ L de 0.5 M EDTA i 28 μ L de 10 mM Tris HCl, pH 7.5. Posteriorment, el mRNA fragmentat va ser purificat utilitzant les esferes magnètiques de la solució Agencourt® RNAClean® XP (Beckman Coulter) realitzant dos cicles de rentat, i finalment, el mRNA fragmentat es va recuperar en 19 μ L de tampó 10 mM Tris HCl, pH 7.5. Un microlitre de la mostra va ser analitzat en l'equip Agilent 2100 Bioanalyzer amb el RNA 6000 Pico Xip (Agilent Technologies) per tal d'avaluar la fragmentació realitzada.

Taula 4.1 Composició de la solució fragmentadora

Solució Fragmentadora RNA	
Component	Volum 10 mL
Pols de ZnCl ₂	0.1363 g
1 M Tris-HCl pH 7.0	1 mL
Aigau Ultrapura	Fins a 10 mL

A partir del mRNA obtingut de les diferents mostres es va realitzar la síntesi del cDNA de doble cadena (dscDNA). A cada mostra es va afegir 4 μ L d'encebadors aleatoris (400 μ M Primer Random Roche) i es va incubar a 70°C durant 10 minuts per permetre una millor hibridació dels encebadors al mRNA. Seguidament es va transferir les mostra en gel i es va procedir a la síntesi del cDNA mitjançant el cDNA Synthesis System Kit (Roche) segons les descripcions del fabricant. Posteriorment a la síntesi del dscDNA, es va realitzar una etapa de purificació amb la solució Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter) i es va procedir a la reparació i fosforil·lació dels extrems dels fragments de cDNA generats amb el GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit (Roche). Finalment el cDNA va ser purificat de nou amb la solució Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter) i es van iniciar els

procediments enfocats a la preparació de les mostres per a la piroseqüenciació. Pel que fa els procediments de preparació i adequació de les mostres a la plataforma de seqüenciació, es van desenvolupar al Servei de Seqüenciació Massiva del Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG) per part del propi servei. Aquests procediments van consistir en la lligació dels adaptadors A (5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-3') i els adaptadors B (5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG-3') de Roche&454 a les mostres de cDNA en primer terme i, posteriorment, en la purificació de les mostra amb la solució Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter) per tal d'eliminar petits fragments i adaptadors sobrants de les llibreries generades.

Finalment es van quantificar les llibreries resultants a més d'analitzar-ne la qualitat per tal de dissenyar la PCR en emulsió pròpia de la plataforma de piroseqüenciació.

4.4.6 ELECTROFORESIS CAPIL·LAR I ESPECTROFOTÒMETRE UV

Les quantificacions de les mostres de RNA i cDNA que es van realitzar al llarg del desenvolupament de la metodologia, es van realitzar amb l'espectrofotòmetre NanoDrop® ND-1000 (ThermoScientific) amb un volum de mostra de 1 µL. Les quantificacions es van realitzar en base a les lectures d'absorbància de longitud d'ona a 260 nm i 280 nm i van ser calculades automàticament pel programa de l'equip. L'anàlisi de qualitat de les mostres es va dur a terme per electroforesi capil·lar en l'equip Agilent 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies). Per a les mostres de cDNA es va analitzar 1 µL amb el Kit Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies), i per a les mostres de RNA es va analitzar 1 µL en els kits Agilent RNA 6000 Nano Kit, o bé Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies).

Les quantificacions i les anàlisis de qualitat es van realitzar al llarg de tot el desenvolupament de la metodologia, com a eines d'avaluació dels rendiments i qualitat de la mostra durant els procediments implementats.

4.4.7 PCR EN EMULSIÓ

Per a cada una de les llibreries de cDNA resultants es va realitzar una PCR en emulsió (veure fig. 4.3) segons el manual "*emPCR Method Manual*". Durant la PCR en emulsió, la llibreria de cDNA va ser desnaturalitzada i barrejada amb les esferes de sefarosa que contenen covalentment lligat un encebador complementari a la seqüència de l'adaptador B de Roche&454. La relació de mescla 1:1 va ser ajustada segons la quantificació realitzada per la llibreria.

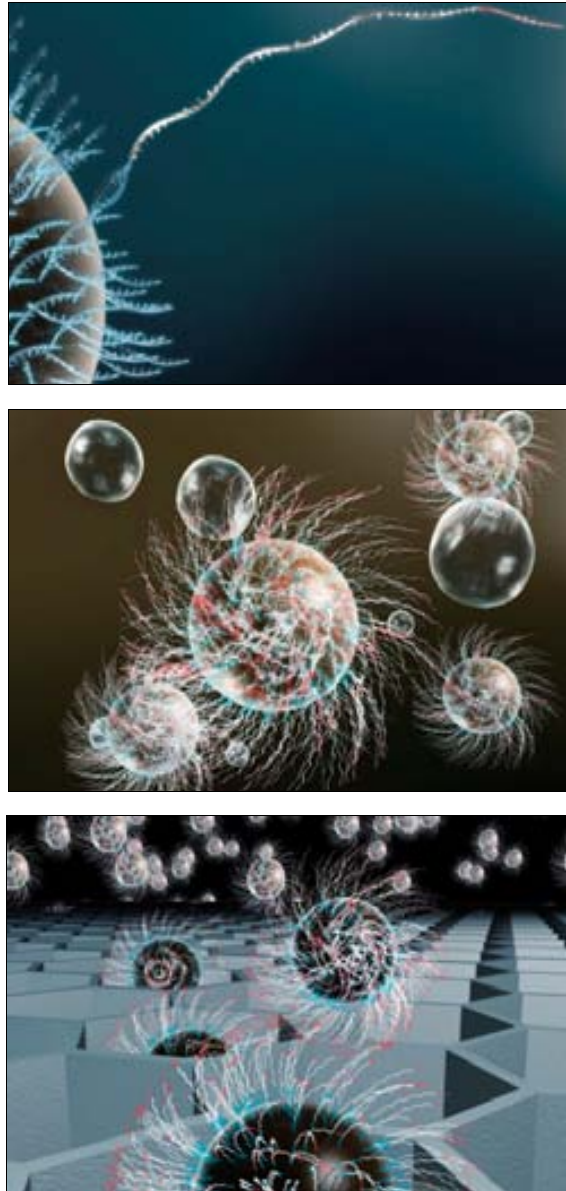


Figura. 4.3 La imatge superior mostra conceptualment la lligació específica de cada esfera de sefarosa amb un fragment monocadena de la llibreria de cDNA generada. La imatge intermèdia representa la reacció de PCR en emulsió que es realitza per a cada esfera en una mescla d'aigua i oli. Les esferes són retingudes en l'oli d'emulsió funcionant com a microreactors d'amplificació, i generant milions de còpies del fragment. Finalment es trenca l'emulsió i es recuperen les esferes amplificades per a ser carregades en la placa de seqüenciació (PTP). La imatge inferior mostra el carregament de la mostra en la placa PTP. Durant la reacció de seqüenciació els nucleòtids van fluint seqüencialment pels pouets de la placa PTP. Cada incorporació de nucleòtid complementari, per cicle de seqüenciació resulta en una senyal quimioluminiscent que és registrada per l'equip de piroseqüenciació.

Posteriorment, les esferes de cDNA es van afegir a la preparació de la PCR juntament amb l'oli d'emulsió i es va generar l'emulsió per agitació (Tissue Lyser, Qiagen) segons les condicions definides per el protocol. Seguidament, es va al·liquotar l'emulsió en plaques de PCR i es van realitzar 50 cicles d'amplificació. Un cop finalitzada la PCR en emulsió es va afegir isopropanol per trencar l'emulsió i recuperar les esferes de cDNA en medi aquós.

Les esferes de cDNA amplificades van ser seleccionades mitjançant un encebador biotinilat complementari a la seqüència de l'adaptador A de Roche&454. La selecció es va produir per la unió de la biotina de l'encebador a l'estreptavidina d'unes altres esferes magnètiques, de manera que les esferes de cDNA no amplificades no quedaven unides a les esferes magnètiques i van ser descartades durant la selecció per imant.

4.4.8 PIROSEQÜENCIACIÓ

La plataforma de seqüenciació massiva de Roche&454 GS FLX Titanium es basa en la tecnologia de seqüenciació per síntesi, on l'encebador de seqüenciació és complementari a la seqüència de l'adaptador A lligat a les llibreries de cDNA. Amb la particularitat que el motlle a seqüenciar és amplificat prèviament en la superfície d'unes esferes, en una etapa anomenada PCR en emulsió. La seqüenciació es dur a terme directament sobre les esferes de cDNA carregades sobre la placa de seqüenciació (PTP, Pico Titer Plate) juntament amb els enzims encarregats de transformar el pirofosfat (producte de la incorporació d'un dNTP) a ATP i aquest en llum. Els nucleòtids i els substrats de reacció van ser carregats a la màquina i renovats en cada cicle de seqüenciació. Realitzant 200 cicles de quatre nucleòtids i per a cada un d'ells se'n va generar una fotografia. Els algorismes de processament d'imatges de l'equip analitzen totes les imatges recollides i transformen les senyals lumíniques en informació de seqüència associada a una posició de la PTP. Com a control de qualitat els algorismes de processament de senyal analitzen totes les seqüències i descarten aquelles que no compleixen els estàndards de Roche&454.

4.5 RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.5.1 EXTRACCIÓ DE RNA

Les difícils característiques de la mostra, juntament amb els requeriments quantitius i qualitius de RNA per a dur a terme l'estudi metatranscriptòmic, van fer de l'etapa d'extracció un pas crític a optimitzar. Les experimentacions en aquest sentit es van centrar en set procediments comercials que van ser implementats segons els protocols definits. L'avaluació dels rendiments d'extracció de cada un dels mètodes es va realitzar en primer terme mitjançant el NanoDrop® ND-1000 (ThermoScientific) amb un volum de mostra de 1 µL per a cada procediment testat. A la Taula 4.2 es mostren les diferents quantificacions realitzades per a cada mostra en funció del

procediment d'extracció de RNA seguit, així com les diferents ràtios d'absorbància utilitzades per avaluar la puresa de la mostra.

La relació d'absorbàncies a 260nm i 280nm s'utilitza com a mesura d'anàlisi de la puresa de mostres de DNA i RNA (Glasel, 1995). En mostres de DNA una ràtio 260/280 de ~1.8 és considerada una mostra de DNA pura, mentre que en mostres de RNA generalment una ràtio 260/280 de ~2.0 és acceptada com a pura. En cas que el valor d'aquesta ràtio sigui apreciablement inferior, indica la presència de proteïnes, fenols o altres contaminants que absorbeixen fortament a 280 nm. Una altre ràtio d'absorbància utilitzada en l'avaluació de la qualitat de mostres d'àcids nucleics és la ràtio 260/230. Els valors esperats per a aquesta ràtio en mostres pures oscil·len entre 2.0 - 2.2, de manera que valors inferiors indiquen la presència de contaminants que absorbeixen a 230 nm, relacionats sobretot amb la presència de proteïnes, els aminoàcids aromàtics de les quals absorbeixen a aquesta longitud d'ona.

Taula 4.2 Quantificacions de RNA total obtingudes amb espectrofotometria UV, NanoDrop® ND-1000 (ThermoScientific). Cada mostra i procediment va ser processat per duplicat, mostrant-se en la taula la millor extracció del duplicat. Per a cada quantificació es mostren les ràtios 260/280 i 260/230 de la mostra com a mesura de puresa i qualitat del RNA. n.d.(no disponible)

	Quantificacions					
	Zona alta		Zona mitja		Zona baixa	
High Pure RNA Isolation Kit (Roche) ♣	20.6 ng/μL	260/280 = 1.26 260/230 = 0.94	26.12 ng/μL	260/280 = 1.04 260/230 = 0.86	15.9 ng/ul	260/280 = 0.79 260/230 = 0.25
SV Total RNA Isolation System (Promega) ♣	3.12 ng/μL	260/280 = 1.04 260/230 = 0.25	0.60 ng/μL	260/280 = 1.13 260/230 = 0.73	1.10 ng/μL	260/280 = 0.75 260/230 = 0.55
RiboPure™-Bacteria (Ambion)	3132 ng/μL	260/280 = 1.30 260/230 = 1.15	2863.25 ng/μL	260/280 = 1.06 260/230 = 1.21	2844 ng/μL	260/280 = 1.01 260/230 = 1.39
TRI Reagent® Solution (Ambion)	9.32 ng/μL	260/280 = 1.11 260/230 = 1.00	n.d.	260/280 = n.d. 260/230 = n.d.	n.d.	260/280 = n.d. 260/230 = n.d.
RNeasy®Protect Bacteria Kit (Qiagen)	2.34 ng/μL	260/280 = 1.69 260/230 = 1.23	n.d.	260/280 = n.d. 260/230 = n.d.	n.d.	260/280 = n.d. 260/230 = n.d.
PowerBiofilm™ RNA Isolation Kit (MoBio) ♣	17.49 ng/μL	260/280 = 2.19 260/230 = 1.83	26.12 ng/μL	260/280 = 1.83 260/230 = 1.89	12.60 ng/μL	260/280 = 1.87 260/230 = 1.07
RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit (Mobio)	1641.24 ng/μL	260/280 = 2.13 260/230 = 2.22	1231.95 ng/μL	260/280 = 2.14 260/230 = 2.24	1519.65 ng/μL	260/280 = 2.13 260/230 = 2.16

♣ El tractament amb DNAsa forma part del procediment.

Els rendiments d'extracció obtinguts, valorats en ng/μL de RNA, juntament amb les ràtios d'absorbància 260/280 i 260/230, van ser els principals criteris d'avaluació de les metodologies. D'entrada, l'elecció de la metodologia d'extracció definitiva passava per escollir el procediment que maximitzés la quantitat de RNA extret i que mostrés

unes ràtios 260/280 i 260/230 òptimes. D'aquesta manera els procediments comercials *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche), *SV Total RNA Isolation System* (Promega), *TRI Reagent® Solution* (Ambion) i el *RNeasy®Protect Bacteria Kit* (Qiagen) van ser descartats en primer terme, degut al baix rendiment d'extracció i a la pobre qualitat de les mostres obtingudes (en base a les ràtios 260/280 i 260/230). Les experimentacions dels kits *TRI Reagent® Solution* (Ambion) i el *RNeasy®Protect Bacteria Kit* (Qiagen) únicament es van desenvolupar amb les mostres de la zona alta del bioreactor al no considerar necessària la seva implementació en les altres mostres.

Tot i les evidents diferències entre els rendiments dels diferents protocols restants, especialment entre el *PowerBiofilm™ RNA Isolation Kit* (MoBio), el *RiboPure™-Bacteria* (Ambion) i el *RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit* (Mobio), calia considerar el tractament diferencial amb DNAsa per part del *PowerBiofilm™ RNA Isolation Kit* (MoBio). D'aquesta manera, per poder comparar els rendiments globals dels tres procediments, les quantificacions es van realitzar posteriorment al tractament amb DNAsa (taula 4.3).

Taula 4.3 Quantificacions de RNA total obtingudes posteriorment al tractament amb DNAsa. Valors obtinguts amb NanoDrop® ND-1000 (ThermoScientific). Per a cada quantificació es mostren les ràtios 260/280 i 260/230 de la mostra com a mesura de puresa i qualitat del RNA.

	Quantificacions		
<i>PowerBiofilm™ RNA Isolation Kit</i> (MoBio)	Zona alta	17.49 ng/μL	260/280 =2.19 260/230 =1.83
	Zona mitja	26.12 ng/μL	260/280 =1.83 260/230 =1.89
	Zona baixa	12.60 ng/μL	260/280 =1.87 260/230 =1.07
<i>RiboPure™-Bacteria</i> (Ambion)	Zona alta	2.5 ng/μL	260/280 =1.17 260/230 =0.35
	Zona mitja	0.6 ng/μL	260/280 =1.08 260/230 =0.16
	Zona baixa	1.8 ng/μL	260/280 = 1.25 260/230 = 1.0
<i>RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit</i> (Mobio)	Zona alta	1169.81 ng/ul	260/280 = 1.98 260/230 = 2.17
	Zona mitja	1052.92 ng/ul	260/280 = 1.97 260/230 = 2.12
	Zona baixa	1236.98 ng/ul	260/280 = 1.99 260/230 = 2.13

A partir de les quantificacions realitzades posteriorment al tractament amb DNAsa es va poder observar que la metodologia que oferia millors rendiments en l'extracció del RNA total a partir de les mostres provinents del biofiltre percolador va ser el procediment del *RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit* (Mobio) juntament amb el tractament per eliminar DNA TURBO DNA-free™ Kit (Ambion). El rendiment en l'obtenció de RNA i les ràtios 260/280 i 260/230 òptimes d'aquestes mostres, en van ser el criteris de justificació i van permetre superar l'etapa crítica d'extracció de RNA total.

El desenvolupament de la metodologia posterior per a l'estudi del metatranscriptoma del bioreactor es va continuar segons el procediment descrit amb mostres de biomassa obtingudes al cap de 350 dies de la posada en marxa de la planta.

4.5.2 ENRIQUIMENT I PURIFICACIÓ DEL MRNA

Els requeriments quantitatius i qualitius de les mostres de RNA en el procediment d'enriquiment de mRNA van fer que cada mostra fos ajustada singularment a la metodologia del MICROBExpress™ (Ambion). El volum de mostra a processar per a cada alíquota es va calcular en base les quantificacions realitzades amb el NanoDrop® ND-1000 (ThermoScientific) i considerant els requeriments descrits pel fabricant. A la taula 4.4 es recullen les alíquotes definitives processades i les respectives quantificacions fetes amb el Nanodrop® ND-1000 (ThermoScientific). Després del procés d'enriquiment de mRNA, les mostres van ser purificades amb el Kit MEGAclean™ (Ambion) generant les alíquotes finals de mRNA per a la preparació de la llibreria de cDNA.

Taula 4.4 Rendiments d'enriquiment i purificació de mRNA de les mostres processades. Valors obtinguts amb NanoDrop® ND-1000 (ThermoScientific). Per a cada quantificació es mostren les ràtios $A_{260/280}$ i $A_{260/230}$ de la mostra com a mesura de puresa i qualitat del RNA. Cada mostra va ser processada per triplicat, mostrant-se a la taula únicament les alíquotes definitives processades. Volum proc. (processat); obt. (obtingut).

	Volum proc.	Enriquiment mRNA▲	Volum obt.	NanoDrop®		Purificació	Volum obt.	NanoDrop®	
Zona alta	8 µL (9358.5 ng)	MICROBExpress™	18 µL	496.42 ng/µL	$260/280 = 2.04$ $260/230 = 2.18$	MEGAclean™	25 µL	36.69 ng/µL	$260/280 = 1.95$ $260/230 = 1.04$
Zona mitja	10 µL (10529.2 ng)	MICROBExpress™	22 µL	408.89 ng/µL	$260/280 = 2.08$ $260/230 = 2.19$	MEGAclean™	25 µL	26.40 ng/µL	$260/280 = 1.90$ $260/230 = 0.34$
Zona baixa	8 µL (9895.84 ng)	MICROBExpress™	22 µL	352.97 ng/µL	$260/280 = 2.06$ $260/230 = 2.27$	MEGAclean™	25 µL	22.56 ng/µL	$260/280 = 2.04$ $260/230 = 0.41$

▲ Requeriments RNA entrant: $A_{260/280} > 1.7$; Volum Màx. 15 µL; Quantitat Màx. 10 µg

Paral·lelament a la quantificació i anàlisi de les mostres realitzada amb el Nanodrop, es va analitzar la qualitat del mRNA obtingut per electroforesi capil·lar en l'equip Agilent 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies). La qualitat dels mRNAs es va validar mitjançant l'anàlisi dels electroforogrames (Fig. 4.4). En tots els casos, el perfils obtinguts van confirmar el manteniment de la integritat de les mostres després de les etapes d'enriquiment i purificació, donant validesa als procediments desenvolupats fins al moment. A més, es va confirmar la no presència de molècules de DNA residuals en les mostres finals obtingudes, i la baixa presència de molècules de 16S i 23S rRNA, confirmant la idoneïtat de les mostres per a un estudi metatranscriptòmic. De la mateixa manera, els electroforogrames dels mRNAs finals permetien observar la distribució de les longituds de les molècules de mRNA que composaven les mostres. Les mides obtingudes a partir de la nostra mostra van

resultar ser considerablement inferiors a les mostres representatives exemplificades en el manual de preparació de la llibreria de cDNA. Aquest fet va sorprendre d'entrada i va plantejar la idea d'una possible degradació de les mostres de mRNA obtingudes. Tot i així, el fet d'assolir els requeriments de RNA definits pel manual i tenint en compte l'origen diferencial de les mostres es va decidir continuar amb el desenvolupament de la metodologia del procés per a la síntesi del cDNA.

El manual de preparació "*cDNA Rapid Library Preparation Method Manual*" és desenvolupat en base RNA eucariotes tot i ser considerat un mètode de preparació estandaritzat per a tot tipus de mostres de RNA que compleixin els requisits de quantitat i qualitat definits pel manual.

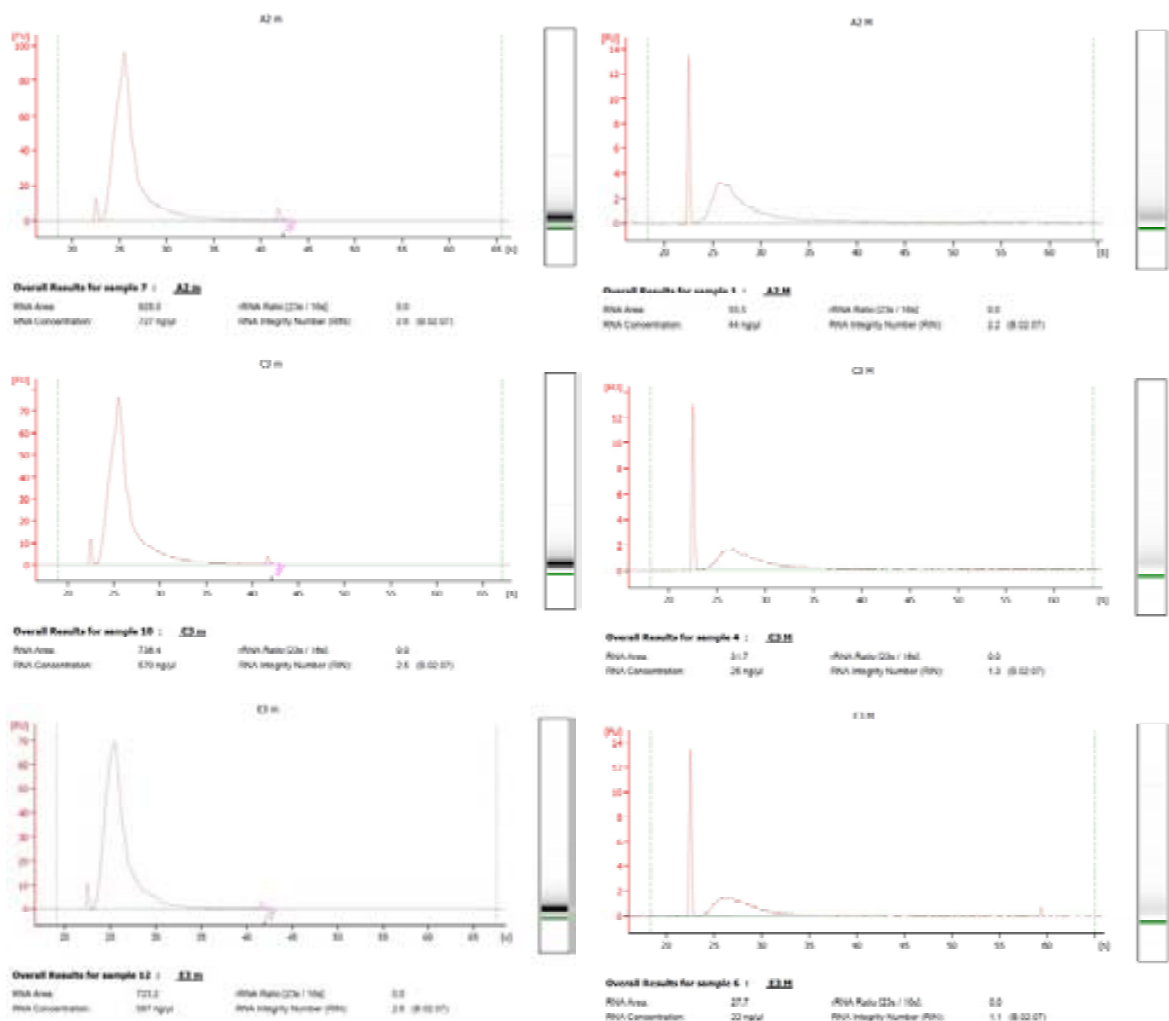


Figura 4.4 Electroforogrames de les mostres processades obtinguts amb el Agilent RNA 6000 Nano Kit en l'equip Agilent 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies). A2, mostra zona alta; C3, mostra zona mitja; E3, mostra zona baixa. (m: després MICROBExpress; M: després MEGAClear).

4.5.3 METODOLOGIA DE PREPARACIÓ DE LA LLIBRERIA DE CDNA

El seguiment inicial de la metodologia segons el manual estandarditzat “*cDNA Rapid Library Preparation Method Manual*” va implicar diferents etapes de processament de la mostra. Cada un dels procediments definits pel manual van ser experimentats i provats amb l'objectiu de confirmar i desenvolupar la metodologia definitiva per a la preparació de les llibreries de cDNA.

Assolits els requeriments de mRNA inicial descrits en el manual de preparació de les llibreries de cDNA es va dur a terme la fragmentació de la mostra segons definia el procediment de la metodologia. A la figura 4.5 es mostren els electroforogrames resultants d'una de les mostres de mRNA finals analitzades amb l'equip Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) prèviament i posterior al tractament de fragmentació desenvolupat. El sentit del procediment de fragmentació recollit en el manual de Roche&454, juntament amb els requeriments de RNA definits pel mètode, consistien en la normalització de les característiques de les mostres de RNA, prèviament a la preparació de les llibreries de cDNA. Analitzant els perfils obtinguts i comparant-los amb els perfils esperats descrits per Roche&454, es va valorar el rendiment del procediment i la idoneïtat de la fragmentació.

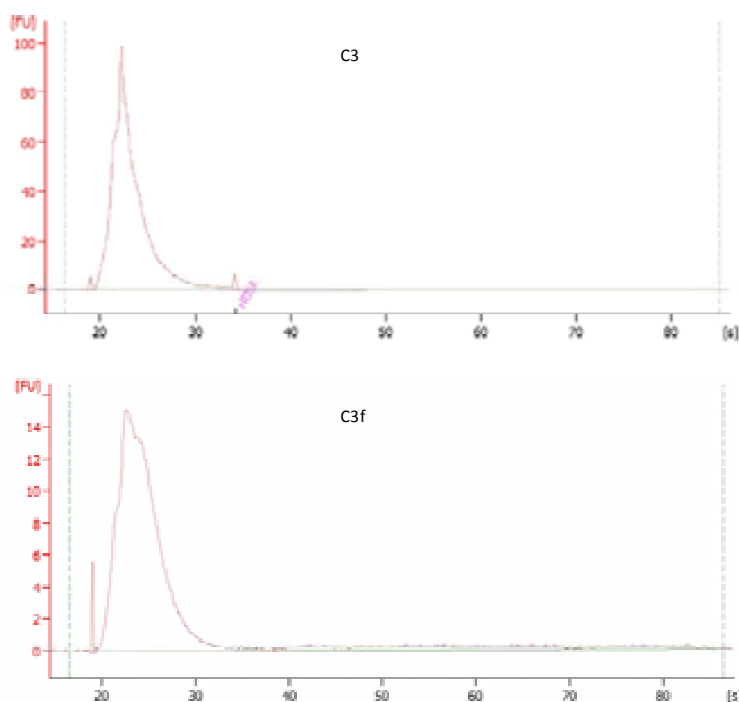


Figura 4.5 Electroforogrames de la mostra de la zona mitja del biofiltre percolador. Perfils obtinguts amb el Agilent RNA 6000 Pico Kit en l'equip Agilent 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies). C3 correspon a la mostra prèvia al tractament de fragmentació. C3f correspon a la mostra posteriorment al procediment de fragmentació.

Segons els electroforogrames resultants, l'etapa de fragmentació del RNA implementada a les mostres provinents del biofiltre, bàsicament va resultar en una disminució de la quantitat de RNA total de les mostres, degut al propi procés de recuperació de les mostres, però en cap cas el tractament va modificar la distribució inicial de la mida dels RNAs de la mostra. Probablement, la funció del procés de fragmentació, estava enfocada a la preparació de mostres de mRNA d'eucariotes, per tal de normalitzar la grandària dels mRNAs d'aquests. La singular distribució de mides de mRNA que conformaven les mostres provinents del biofiltre (figura 4.4) diferien considerablement de les de mostres ideals eucariotes que exemplificava el manual. Aquest fet, conjuntament amb els resultats obtinguts en les proves de fragmentació realitzades, van conduir a la decisió de no implementar l'etapa de fragmentació en la metodologia de preparació de les llibreries de cDNA a partir de les nostres mostres.

Un cop eliminat aquest pas del processat de les mostres, es va continuar el desenvolupament de la metodologia ajustant les quantitats de mRNA inicials necessàries per a la síntesi de dscDNA. Un cop obtingut aquest, es van reparar i fosforil·lar els extrems dels cDNAs generats, segons la metodologia descrita en el manual.

Un cop obtingut el cDNA a partir de la mostra de RNA es va procedir a la lligació dels adaptadors A i B de Roche 454 modificats amb els identificadors de llibreries múltiples (MID) i a la posterior purificació dels productes lligats. A la figura 4.6 es mostren els perfils de Bioanalyzer obtinguts per les mostres processades durant els procediments lligació i purificació. Observant els diferents electroforogrames, a mesura que es van enllaçant les diferents etapes del procediment d'obtenció de la mostra, pot determinar-se com l'origen de la mostra i per tant, la posició dins el biofiltre influeix en la quantitat de cDNA obtingut. No obstant, els perfils de les tres mostres són comparables entre ells i entre les diferents etapes del procediment, fet significatiu del bon funcionament de la reacció de transcripció inversa i de les lligacions i purificacions implementades. Com era d'esperar, els perfils obtinguts després de la lligació dels adaptadors denotaven un desplaçament de totes les mostres cap a un major pes molecular, indicant el bon funcionament de les lligacions realitzades. També és observable en els perfils de Bioanalyzer la presència d'un pic corresponent als adaptadors sobrats de la lligació.

Posteriorment a l'etapa de lligació, es va desenvolupar l'adaptació del procediment de purificació estàndard, a les característiques de les mostres d'aquest treball. El protocol estàndard basat en la solució Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter) elimina totes les molècules inferiors a 500 parells de bases. Donada la mida de les

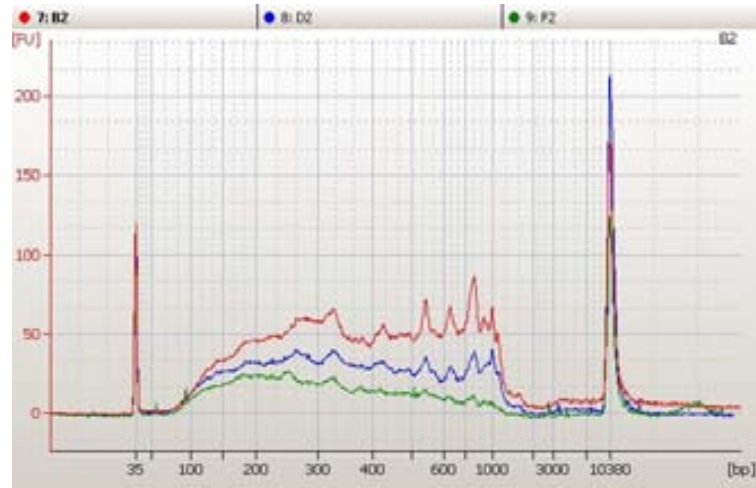
mostres obtingudes va ser necessari modificar el procediment de purificació per tal d'eliminar només les restes d'adaptadors i petites molècules. A partir de la titulació de les esferes AMPure® XP, es van escollir les condicions de purificació per tal d'eliminar totes les molècules inferiors a 150 parells de bases. El procediment de purificació específic adaptat es va implementar dues vegades per assegurar l'eliminació dels adaptadors. Prèviament a l'anàlisi de qualitat final amb el Bioanalyzer, es van concentrar les mostres per a poder detectar més fàcilment possibles contaminacions d'adaptadors.

Els perfils obtinguts per les llibreries finals van confirmar la qualitat de les mostres definitives i van conduir l'últim pas previ a la seqüenciació, la quantificació de les llibreries. Aquesta es va realitzar en base la construcció d'una recta patró amb un DNA de concentració coneguda marcat fluorescentment igual que un dels adaptadors. A partir de les lectures fluorimètriques i de les longituds dels cDNA segons els perfils de Bioanalyzers, es va poder quantificar el nombre de molècules que configuraven cada llibreria (taula 4.5). A partir de les quantificacions obtingudes es va dissenyar la PCR en emulsió pròpia de la plataforma de piroseqüenciació.

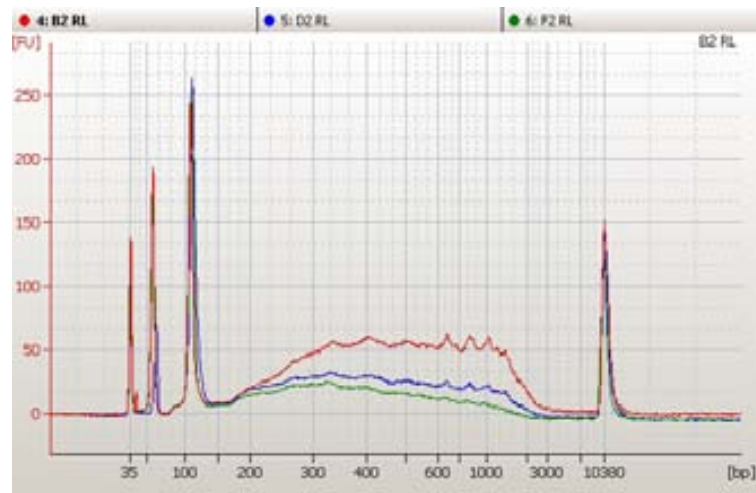
Taula 4.5 Quantificació de les llibreries de cDNA preparades per a piroseqüenciar.

Mostra	MID	ng/μL	Molècules/μL	Molècules totals
Zona Alta	RL MID 10	1,17	1,53E+09	3,06E+10
Zona Mitja	RL MID 11	0,94	1,23E+09	2,47E+10
Zona Baixa	RL MID 12	0,69	9,01E+08	1,80E+10

a)



b)



c)

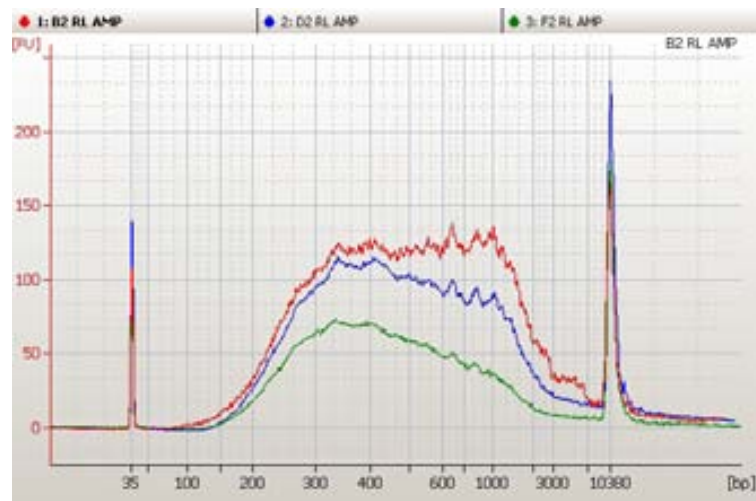


Figura 4.6 Electroforogrames de les mostres de cDNA. Control de qualitat amb l'equip Agilent 2100 Bioanalyzer®, amb el High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies). Perfil vermell (mostra B2), representa la mostra de la zona alta. Perfil blau (D2), representa la mostra zona mitja. Perfil verd (F2), representa la mostra zona baixa. a) Perfils del Bioanalyzer® de les mostres originals dscDNA. b) Perfils del Bioanalyzer® posteriorment a la lligació dels adaptadors. c) Perfils del Bioanalyzer® de les llibreries finals posteriorment al tractament amb AMPure® XP (Beckman Coulter).

4.5.4 PIROSEQÜENCIACIÓ

La placa PTP de piroseqüenciació va ser dividida en dues regions on s'hi van carregar les tres mostres d'aquest treball (zona alta, mitja i baixa del bioreactor). Cada una de les mostres d'aquest treball va ser marcada diferencialment amb identificadors de llibreries múltiples (MID) per tal de permetre la seva identificació posterior (taula 4.7).

La primera regió de la placa (50% de la PTP) correspon a les mostres de la zona alta i mitja del biofiltre percolador. La segona regió en canvi, correspon a la mostra de la zona baixa i a la d'un altre investigador amb el que es va compartir la placa (representant un 25% de la PTP cada mostra). A la taula 4.6 es mostren els valors estadístics de la reacció de piroseqüenciació, on es poden observar els nombres dels rendiments de la reacció en termes de qualitat segons els criteris definits per l'equip, així com en termes de longitud i nombre de bases seqüenciades.

Taula 4.6 Estadístics de la seqüenciació. Valors relatius a cada una de les dues zones de la placa PTP així com del total de la reacció.

	1	2	Total
Raw Wells	1.037.601	939.634	1.977.235
Key Pass Wells	990.582	900.118	1.890.700
Dot	124.678	68.976	193.654
Mixed	69.691	93.808	163.499
Failed			
Short Quality	271.456	262.74	534.196
Short Primer	2.657	3.171	5.828
Passed Filter Wells	521.974	471.293	993.267
% Dot + Mixed	19.62	18.08	18.89
% Short	27.67	29.54	28.56
% Passed Filter	52.69	52.36	52.53

	1	2	Total
Total Bases	113.714.588	122.568.715	236.283.303
Length Average	217.85	260.07	237.88
Length Std Deviation	110.07	145.45	-
Longest Reads Length	897	713	897
Shortest Reads Length	40	40	40
Median Reads Length	203.0	235.0	214.0

La seqüenciació de la mostra va generar arxius “.sff” (standard flowgram format), “.fasta” i “.qual” per a cada una de les regions de la placa. Les diferents mostres barrejades dins una mateixa regió de la placa PTP van ser identificades i separades bioinformàticament per les seqüències dels identificadors de llibreries múltiples (MID) dels adaptadors utilitzats (taula 4.7). Els MIDs estan dissenyats per a consumir el

nombre mínim de cicles de seqüenciació i continuar essent únics fins i tot si es produeix un error de seqüenciació.

Taula 4.7 Descripció dels identificadors de llibreries múltiples (MID) presents en els adaptadors utilitzats per a les mostres seqüenciades. Es mostren el nombre de lectures per a cada mostra en funció de la identificació feta en base la seqüència del MID.

Mostra	Nom 454	MID	Seqüència MID	# Lectures
Zona Alta	RR_B2	RL MID 10	ACTACGTCTCT	271159
Zona Mitja	RR_D2	RL MID 11	ACTATACGAGT	249650
Zona Baixa	RR_F2	RL MID 12	ACTCGCGTCGT	259583

Posteriorment a la identificació realitzada on es van catalogar totes les lectures de la placa PTP en funció del origen de la mostra, es va comprovar les longituds d'aquestes a partir dels gràfics de la figura 4.7, on es van avaluar per a cada mostra les distribucions de les longituds de les lectures així com la seva freqüència. Les longituds de lectura no consideren les posicions dels adaptadors A i B de seqüenciació, a diferència dels MIDs que si són considerats.

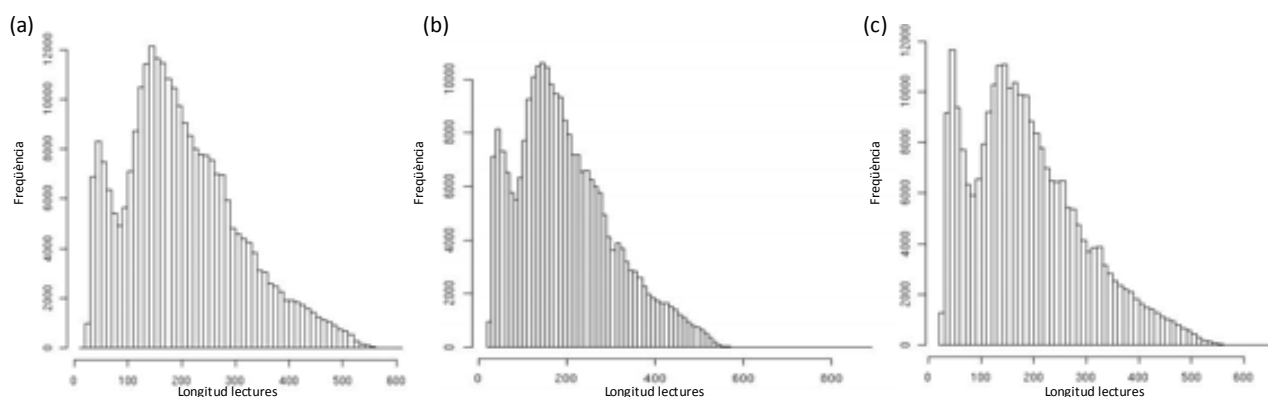


Figura 4.7 Distribucions de les longituds de les lectures obtingudes en la reacció de piroseqüenciació. (a) Mostra RR_B2; (b) mostra RR_D2; (c) mostra RR_F2.

Es va observar que les longituds de lectura obtingudes en les diferents mostres presentaven unes distribucions similars tant en freqüència com en longitud, confirmant una piroseqüenciació uniforme en totes les mostres i zones de la placa PTP.

A partir de les taules i figures presentades es va poder validar la pròpia reacció de piroseqüenciació donant fiabilitat a la informació de seqüència generada, i per tant permeten el posterior assemblatge de lectures i anàlisis bioinformàtica.

4.6 CONCLUSIONS

A partir de l'experimentació realitzada amb l'objectiu de desenvolupar un estudi de metatranscriptòmica del biofiltre percolador tractant altes càrregues d'H₂S, s'ha optimitzat i definit la metodologia necessària a implementar per a obtenir el metatranscriptoma del bioprocés. S'han assolit els requeriments quantitius i qualitius de mRNA necessaris per a la generació de les llibreries de cDNA, provant diferents mètodes d'extracció i purificació. Finalment, pel seu rendiment en l'extracció de RNA i per la qualitat de les mostres obtingudes, es va determinar com a mètode d'elecció l'ús dels procediments *RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit* (Mobio) juntament amb el *TURBO DNA-free™ Kit* (Ambion). L'enriquiment de mRNA i purificació de les mostres es va desenvolupar amb les metodologies *MICROBExpress™* (Ambion) i *MEGAclean™* (Ambion). Les importants concentracions de mRNA de qualitat, assolides amb la metodologia descrita van permetre superar l'etapa crítica d'extracció i purificació, i fer possible el desenvolupament de l'estudi metatranscriptòmic del biofiltre percolador.

El mètode de preparació de les llibreries de cDNA a partir del mRNA obtingut del biofiltre ha estat adaptat i configurat específicament per a la tipologia de mostres de l'estudi. Cada un dels procediments estàndards definits pel manual de Roche & 454 "*cDNA Rapid Library Preparation Method Manual*" per a la plataforma *GS FLX Titanium Series* (Octubre 2009), va ser experimentat, adaptat i optimitzat per a l'estudi concret d'aquest treball. Dos dels procediments de preparació de les llibreries de cDNA definits en el manual, l'etapa inicial de fragmentació del RNA i la d'eliminació de petits fragments de mRNA, no van ser implementats en la metodologia final definida. Per altra costat, va ser necessari adaptar la purificació de les llibreries generades amb la solució *Agencourt® AMPure® XP* (Beckman Coulter) per tal de no eliminar part de les llibreries de cDNA preparades.

Finalment, amb la metodologia desenvolupada s'ha demostrat la possibilitat d'obtenir el metatranscriptoma d'un bioprocés industrial com és un biofiltre percolador tractant altes càrregues d'H₂S. D'aquesta manera s'exemplifica l'aplicació de la metatranscriptòmica i de l'ús de plataformes de seqüenciació massiva a noves disciplines com és la biotecnologia ambiental.

4.7 REFERÈNCIES

- Booijink,C.C.G.M., Boekhorst,J., Zoetendal,E.G., Smidt,H., Kleerebezem,M., de Vos,W.M., (2010). Metatranscriptome Analysis of the Human Fecal Microbiota Reveals Subject-Specific Expression Profiles, with Genes Encoding Proteins Involved in Carbohydrate Metabolism Being Dominantly Expressed, *Appl. Environ. Microbiol.* 76, pp. 5533-5540.
- Der,J., Barker,M., Wickett,N., dePamphilis,C., Wolf,P., (2011). *De novo* characterization of the gametophyte transcriptome in bracken fern, *Pteridium aquilinum*, *BMC Genomics* 12, p. 99.
- Farrell Jr., Robert., (2009). RNA methodologies. Laboratory guide for isolation and characterization. *Academic Press*. 744pp
- Fleming,J.T., Yao,W.H., Sayler,G.S., (1998). Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: Application to pure culture and soil microcosms, *Appl. Environ. Microbiol.* 64, pp. 3698-3706.
- Frias-Lopez,J., Shi,Y., Tyson,G.W., Coleman,M.L., Schuster,S.C., Chisholm,S.W., DeLong,E.F., (2008). Microbial community gene expression in ocean surface waters, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, pp. 3805-3810.
- Gilbert,J.A., Field,D., Huang,Y., Edwards,R., Li,W., Gilna,P., Joint,I., (2008). Detection of Large Numbers of Novel Sequences in the Metatranscriptomes of Complex Marine Microbial Communities, *PLoS ONE* 3, p. e3042.
- Glasel,J., (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* 18 (1): 62–63.
- Gosalbes,M.J., Durbán,A., Pignatelli,M., Abellan,J.J., Jiménez-Hernández,N., Pérez-Cobas,A.E., Latorre,A., Moya,A., (2011). Metatranscriptomic Approach to Analyze the Functional Human Gut Microbiota, *PLoS ONE* 6, p. e17447.
- Gregory,R., Darby,A.C., Irving,H., Coulibaly,M.B., Hughes,M., Koekemoer,L.L., Coetzee,M., Ranson,H., Hemingway,J., Hall,N., Wondji,C.S., (2011). A *De Novo* Expression Profiling of *Anopheles funestus*, Malaria Vector in Africa, Using 454 Pyrosequencing, *PLoS ONE* 6, p. e17418.
- Kumar,S., Blaxter,M., (2010). Comparing *de novo* assemblers for 454 transcriptome data, *BMC Genomics* 11, p. 571.
- Leininger,S., Ulrich,T., Schloter,M., Schwark,L., Qi,J., Nicol,G.W., Prosser,J.I., Schuster,S.C., Schleper,C., (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils, *Nature* 442, pp. 806-809.
- Logacheva,M., Kasianov,A., Vinogradov,D., Samigullin,T., Gelfand,M., Makeev,V., Penin,A., (2011). *De novo* sequencing and characterization of floral transcriptome in two species of buckwheat (*Fagopyrum*), *BMC Genomics* 12, p. 30.
- Maestre,J.P., Rovira,R., Gamsans,X., Kinney,K.A., Kirisits,M.J., Lafuente,J., Gabriel,D. (2009). Characterization of the bacterial community in a biotrickling filter treating high loads of H₂S by molecular biology tools. *Water Science and Technology* 59[7], 1331-1337.
- Maestre,J.P., Rovira,R., Álvarez-Hornos,F.J., Fortuny,M., Lafuente,J., Gamsans,X., Gabriel,D., (2010). Bacterial community analysis of a gas-phase biotrickling filter for biogas mimics desulfurization through the rRNA approach, *Chemosphere* 80, pp. 872-880.
- Nam,Y.D., Chang,H.W., Kim,K.H., Roh,S.W., Bae,J.W., (2009). Metatranscriptome analysis of lactic acid bacteria during kimchi fermentation with genome-probing microarrays, *International Journal of Food Microbiology* 130, pp. 140-146.
- Poretzky,R.S., Bano,N., Buchan,A., LeClerc,G., Kleikemper,J., Pickering,M., Pate,W.M., Moran,M.A., Hollibaugh,J.T., (2005). Analysis of Microbial Gene Transcripts in Environmental Samples, *Appl. Environ. Microbiol.* 71, pp. 4121-4126.

- Poretsky,R.S., Hewson,I., Sun,S., Allen,A.E., Zehr,J.P., Moran,M.A., (2009). Comparative day/night metatranscriptomic analysis of microbial communities in the North Pacific subtropical gyre, *Environmental Microbiology* 11, pp. 1358-1375.
- Sessitsch,A., Gyamfi,S., Stralis-Pavese,N., Weilharter,A., Pfeifer,U., (2002). RNA isolation from soil for bacterial community and functional analysis: evaluation of different extraction and soil conservation protocols, *Journal of Microbiological Methods* 51, pp. 171-179.
- Tartar,A., Wheeler,M., Zhou,X., Coy,M., Boucias,D., Scharf,M., (2009). Parallel metatranscriptome analyses of host and symbiont gene expression in the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*, *Biotechnology for Biofuels* 2, p. 25.
- Urich,T., Lanzén,A., Qi,J., Huson,D.H., Schleper,C., Schuster,S.C., (2008). Simultaneous Assessment of Soil Microbial Community Structure and Function through Analysis of the Meta-Transcriptome, *PLoS ONE* 3, p. e2527.
- Vila-Costa,M., Rinta-Kanto,J.M., Sun,S., Sharma,S., Poretsky,R., Moran,M.A., (2010). Transcriptomic analysis of a marine bacterial community enriched with dimethylsulfoniopropionate, *The ISME Journal* (2010) 4, 1410–1420
- Warnecke,F., Hess,M., (2009). A perspective: Metatranscriptomics as a tool for the discovery of novel biocatalysts, *Journal of Biotechnology* 142, pp. 91-95.
- Weckx,S., Allemeersch,J., Van der Meulen,R., Vrancken,G., Huys,G., Vandamme,P., Van Hummelen,P., De Vuyst,L., (2011). Metatranscriptome Analysis for Insight into Whole-Ecosystem Gene Expression during Spontaneous Wheat and Spelt Sourdough Fermentations, *Appl. Environ. Microbiol.* 77, pp. 618-626.

CAPÍTOL 5. ANÀLISI BIOINFORMÀTICA I INTERPRETACIÓ DELS RESULTATS DE L'ESTUDI METATRANSCRIPTÒMIC DEL BIOREACTOR DE DESSULFURACIÓ D'ALTA CÀRREGA D'H₂S

Part dels capítols 4 i 5 d'aquesta tesi estan en procés de preparació de publicació:
Rovira, R., Ferreira, P., Guigó, R., Lafuente, J., Gabriel, D., Campoy, S. (2012) "Metatranscriptomic analysis of a desulphurizing biotrickling filter treating high loads of H₂S"

5.1 INTRODUCCIÓ

Les extraordinàries millores en els processos de seqüenciació massiva de DNA han causat, en els últims anys, un creixement exponencial del nombre de genomes seqüenciats generant, a principis de l'any 2012, més de 3100 projectes genòmics complets disponibles *on-line* (GOLD; <http://www.genomesonline.org/>). Excepte en els casos en els que les seqüències es troben sota patent, la majoria de genomes seqüenciats són accessibles en diferents bases de dades públiques com ara GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) o DOE Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov/>) ubicades als EEUU, o bé el EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>) i DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) ubicades a Europa i Japó respectivament. Aquestes bases de dades s'actualitzen diàriament i comparteixen les diferents dades que s'emmagatzemen en cada una d'elles facilitant la cerca d'informació de forma creuada. Entre el conjunt de genomes seqüenciats i els més de 11000 projectes genòmics que es troben en curs, i dels que es disposen seqüències preliminars, la major part dels genomes són relatius a espècies del domini *Bacteria* (més de 8400 genomes) i d'aquests la gran majoria són motivats per investigacions biomèdiques (veure fig. 5.1). En aquest sentit, la quantitat d'informació de seqüències relacionades amb espècies d'origen ambiental és notablement parcial i minoritària respecte a l'existent per a d'altres tipologies d'organismes, ja que únicament el 6% dels projectes de seqüenciació de genomes bacterians estan relacionades amb soques aïllades de mostres ambientals (Pagani *et al.*, 2012).

El procés de seqüenciació d'un genoma passa per diferents etapes. En primer terme, es genera un ampli conjunt de seqüències que gràcies a la seva superposició i amb l'ajut d'eines informàtiques acaben constituint la seqüència contínua que constitueix el genoma amb un grau de cobertura concret, que representa el mínim nombre de vegades que s'ha seqüenciat una mateixa posició del genoma. L'objectiu principal de la majoria dels projectes de seqüenciació és la caracterització funcional del genoma seqüenciat. Per això, un cop obtinguda la seqüència completa, es procedeix a la detecció dels possibles gens presents en el genoma i a la posterior anotació del les regions codificants (ORFs) i RNAs de transferència (tRNAs) i ribosomals mitjançant la utilització d'eines bioinformàtiques com BLAST (Basic Local

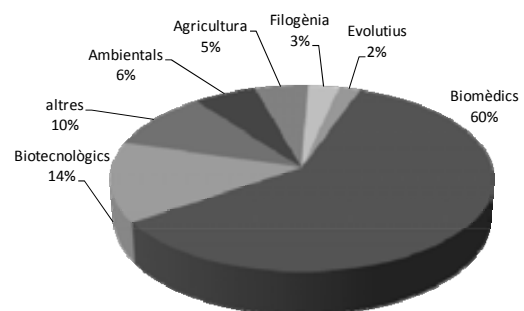


Figura 5.1 Projectes de seqüenciació de genomes bacterians segons les disciplines associades (adaptat de Pagani *et al.*, 2012).

Alignment Sequence Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) que detecten la similitud dels possibles gens i/o els productes gènics del genoma seqüenciat amb les seqüències dipositades a les bases de dades. Per altre banda, també es poden predir la presència de motius comuns en proteïnes o l'estructura secundària d'aquestes mitjançant la comparació dels possibles productes gènics amb bases de dades com UniProt (<http://www.uniprot.org/>) i PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>; Sigrist *et al.*, 2010) estan englobades sota el projecte bioinformàtic d'ExPASy (SIB, Swiss Institute of Bioinformatics; <http://expasy.org/>). Igualment, totes les dades obtingudes també poden associar-se funcions predites mitjançant l'aplicatiu del projecte KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <http://www.genome.jp/kegg/>), aquest és un important dipòsit públic de dades biològiques estructurat en distintes bases de dades especialitzades i enfocades a la caracterització i anotació funcional de les seqüències en àmbits tant diversos com les rutes metabòliques o els dominis funcionals de les seqüències proteïques (Kanehisa *et al.*, 2011). Per altre costat, projectes com el Gene Ontology, (GO) (<http://www.geneontology.org/>; Ashburner *et al.*, 2000) permeten la descripció i anotació de les seqüències en base a l'ontologia gènica d'aquestes. De manera similar i a la vegada antagònica, segons les bases de dades específiques del projecte COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>; Tatusov *et al.*, 2003) és possible classificar filogenèticament les distintes seqüències conforme a les agrupacions ontològiques de les proteïnes resultants. Gràcies a totes aquestes eines, l'anotació funcional dels genomes genera una immensa quantitat d'informació biològica referida a diferents aspectes com ara la funció gènica, l'estructura i filogènia dels genomes, així com les possibles vies metabòliques i les seves regulacions i interaccions (Ward i Fraser; 2005; Sharan i Ideker, 2006; Cardenas i Tiedje, 2008).

Paral·lelament a les eines que permeten l'anotació funcional dels genomes, també han aparegut altres bases de dades com ara PEDANT (<http://pedant.gsf.de/>; Walter *et al.*, 2009) o GOLD (<http://www.genomesonline.org/>; Pagani *et al.*, 2012) que agrupen tota la informació existent dels genomes seqüenciats així com d'aquells que estan en progrés. Aquestes bases de dades permeten agrupar i compartir el coneixement generat derivat de la seqüenciació de genomes. Igualment permeten racionalitzar la investigació, unint esforços pel plantejament de projectes de seqüenciació innovadors que permetin la màxima cobertura de la diversitat microbiana coneguda.

La millora en les tècniques de seqüenciació massiva juntament amb les potents eines bioinformàtiques no només han comportat l'augment exponencial de genomes seqüenciats sinó que també han facilitat l'aparició d'un nou concepte de seqüenciació, la metagenòmica, que pretén, no estudiar el genoma d'un

microorganisme concret, sinó la determinació del material genètic de tota la comunitat microbiana existent en una determinada mostra, sense necessitat d'aïllar i cultivar de forma individual cada un dels components de la comunitat si no analitzant-los tots alhora mitjançant l'extracció global del DNA total de la mostra. Els estudis metagenòmics permeten caracteritzar les poblacions en el seu entorn, donant informació quantitativa dels membres de la comunitat i permeten inclús determinar el potencial metabòlic del microbioma en funció dels gens que apareguin en l'anotació funcional.

L'anotació dels metagenomes requereix, a part de les eines comentades amb anterioritat, altres eines bioinformàtiques amb una gran capacitat d'emmagatzematge que permetin correlacionar i gestionar de forma global un conjunt de dades heterogènies, com per exemple els diferents genomes presents en el metagenoma i associar-los a les diferents bases de dades i eines facilitant així la seva anotació i anàlisi (Walter *et al.*, 2009). Programaris com MEGAN (<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan/>; Huson *et al.*, 2011), Galaxy (<http://main.g2.bx.psu.edu/>; Goecks *et al.*, 2010) o Blast2GO (<http://www.blast2go.com/>; Conesa *et al.*, 2005) són algunes de les estratègies usades en l'anotació funcional *de novo*, així com en l'anàlisi de les enormes quantitats de seqüències anotades mitjançant les interfícies dels propis programes. La interconnexió d'aquests programes informàtics amb les diferents bases de dades i projectes específics com InterPro (Hunter *et al.*, 2011), KEGG (Kanehisa *et al.*, 2011) i GO (Ashburner *et al.*, 2000) permeten categoritzar les seqüències en classes funcionals i ontològiques, així com relacionar-les amb vies metabòliques sense la necessitat d'existència prèvia en els dipòsits públics (Conesa *et al.*, 2005; Huson *et al.*, 2011).

Els metagenomes poden aportar una visió global del potencial metabòlic d'una comunitat, però la presència del DNA d'un microorganisme concret no determina la participació d'aquest en un procés metabòlic concret, encara que quantitativament sigui un dels membres més abundants de la població. Així per a poder aprofundir en l'estudi del metabolisme microbià i la resposta d'una comunitat microbiana front factors ambientals, és necessari realitzar una completa caracterització funcional i una acurada quantificació dels nivells d'expressió dels gens implicats en cada cas (Ishii i Tomita, 2009). Amb la pretensió d'estudiar els metabolismes microbians actius en una determinada comunitat des de la perspectiva d'un sistema integral i no pas des de la valoració de diferents col·leccions parcials interrelacionades entre si, els treballs de metatranscriptòmica esdevenen una aproximació realment vàlida i productiva en aquest sentit. En aquests estudis, també s'usen les mateixes eines de seqüenciació

massiva i de tractament bioinformàtic de les mostres, però s'extreu el mRNA total de la mostra a estudiar, i per tant es determina, de forma quantitativa, l'expressió gènica de la comunitat microbiana. A diferència dels estudis metagenòmics, que donen informació de la composició de les poblacions d'una comunitat, la metatranscriptòmica és capaç de contemplar quantitativament la dinàmica d'expressió gènica per a comunitats complexes entre diferents estats, reflectint l'expressió dels gens actius per a un moment i ambient considerat (Zhang *et al.*, 2010).

5.2. ANTECEDENTS

Durant les últimes dècades han aparegut nombrosos treballs adreçats a l'estudi de l'expressió gènica i del fenotip global resultant dels diferents organismes que conformen les comunitats microbianes, especialment relacionades amb l'àmbit de la biomedicina (Liu *et al.*, 2003; Audia *et al.*, 2008). Aquests transcriptomes han estat típicament analitzats mitjançant l'ús de *microarrays* de DNA. Aquesta aproximació permetia inicialment l'estudi de l'expressió gènica d'una única espècie del conjunt de la comunitat. Tot i que la tècnica ràpidament va permetre l'anàlisi simultani de l'expressió gènica de diferents organismes (Parro *et al.*, 2007; Bulow *et al.*, 2008). Malgrat la seva extensa aplicació, els estudis d'expressió gènica mitjançant *microarrays* de DNA presenten certes limitacions i desavantatges, la més important el fet que pel disseny del *microarray* és necessari conèixer abans la seqüència gènica dels gens dels que es volen determinar les variacions en el patró d'expressió, bé la seqüència completa dels organismes que es volen estudiar (Darby i Hall, 2008). Aquest fet, conjuntament amb la limitada sensibilitat de detecció i quantificació (Gao *et al.*, 2007), fan d'aquesta tècnica una aproximació limitada i inadequada en estudis de metatranscriptòmica ambiental (Darby i Hall, 2008). Una de les altres aproximacions per a l'estudi de l'expressió gènica en mostres ambientals és la tècnica de RT-PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR), però igual que en el cas anterior aquesta aproximació necessita del coneixement previ dels gens que es volen estudiar i la seva aplicació és limitada a considerar pocs gens en un mateix estudi.

La diversificació i creixent accessibilitat de les noves plataformes de seqüenciació massiva han permès ampliar els horitzons d'aplicació d'aquestes tecnologies en nous àmbits de recerca. D'aquesta manera, les noves perspectives d'aplicació estan generant recentment una gran quantitat de treballs de metatranscriptòmica en diverses disciplines d'estudi. L'avantatge més clar d'aquesta aproximació és que permet estudiar l'expressió global de la mostra, sense estar restringida a uns pocs

gens o al coneixement previ dels genomes dels microorganismes que componen la mostra. Els primers estudis de metatranscriptòmica estaven orientats a l'anàlisi global de l'expressió gènica de mostres biològiques complexes es van centrar al voltant d'ecosistemes ambientals, tant aquàtics com terrestres (Urich *et al.*, 2008; Poretsky *et al.*, 2009). Posteriorment han aparegut diversos treballs sota el mateix concepte, en el àmbit de la biomedicina (Gosalbes *et al.*, 2011) o la indústria alimentària (Weckx *et al.*, 2011), entre d'altres. Fins al moment no existeixen treballs de metatranscriptòmica al voltant de bioprocessos ambientals. No obstant, han aparegut alguns estudis en sistemes de tractament d'aigües residuals, on han aplicant plataformes de seqüenciació massiva per a la caracterització de poblacions via la seqüenciació dels gens 16S rRNA (McLellan *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2011). Per altre costat, recentment s'ha publicat un dels primers treballs de metatranscriptòmica orientat a l'expressió gènica sulfur-oxidant, en aquest cas de les comunitats endosimbiòtiques d'una espècie de cloïssa marina (Stewart *et al.*, 2011). Tot i ser un ecosistema notablement diferent al de l'objectiu d'aquesta tesi, el treball de Stewart *et al.* (2011) és l'únic estudi a dia d'avui que ha afrontat el metabolisme sulfur-oxidant des d'un punt de vista global de les comunitats. De manera similar, a partir del procediment metodològic presentat anteriorment i en base a l'anàlisi de l'enorme quantitat d'informació de seqüència generada, es pretén descriure l'activitat metabòlica global del bioprocés com un bon model ecològic d'ambients sulfurosos.

5.3. OBJECTIUS

Amb la motivació final de presentar una anàlisi global del metatranscriptoma del bioreactor de dessulfuració d'alta càrrega d'H₂S, es planteja i es desenvolupa el processament necessari per a la interpretació de les lectures de seqüenciació obtingudes a partir del procediment metodològic desenvolupat en el capítol anterior. En aquest sentit, es proposen i s'experimenten diferents estratègies d'assemblatge de lectures, amb intenció d'optimitzar l'etapa de reconstrucció de les seqüències completes de cDNA obtingudes a partir del mRNA de les mostres. Seguidament a l'estratègia d'assemblatge elegida, es planteja l'anàlisi bioinformàtic del conjunt de seqüències assemblades, mantenint la diferenciació de les tres mostres considerades. Mitjançant l'anàlisi per similitud de seqüència en distintes bases de dades es pretén obtenir l'anotació i caracterització funcional del conjunt de seqüències assemblades. Amb l'objectiu final de realitzar una anàlisi comparativa a nivell d'expressió gènica entre les zones alta, mitja i baixa del biofiltre es planteja la quantificació dels nivells d'expressió dels respectius gens obtinguts en cada una de les zones. Així doncs, en base a l'anàlisi bioinformàtica i la interpretació de les dades

resultants es busca descriure l'activitat metabòlica global del procés, amb intenció d'aprofundir en el coneixement biològic d'aquests sistemes de dessulfuració d'alta càrrega d'H₂S.

5.4 MATERIALS I MÈTODES

5.4.1 ASSEMBLATGE DE SEQÜÈNCIES

La utilització d'identificadors de llibreries múltiples (MID) en la reacció de piroseqüenciament va permetre identificar i processar independentment les lectures obtingudes segons l'origen de la mostra. Com a primer processament de les lectures crues va ser necessari definir el mètode d'assemblatge de les seqüències amb l'eina "GS Assembler" del programa "454 Sequencing System Software" (versió 2.5.3, desembre 2010). Com a primera aproximació es va decidir procedir amb un assemblatge *de novo*, contraposadament al "*mapping*" de les lectures amb genomes referència. Tot i disposar d'eines especialitzades com el "*Transcriptome de novo assembly*", l'origen i característiques de les mostres d'aquest treball van fer descartar ràpidament aquesta configuració. L'anàlisi i el càlcul d'aquest assemblatge es basa en la cobertura dels múltiples exons i variants de "splicing" possibles de la transcripció, així doncs, un assemblatge adequat per a transcriptomes eucariotes que no són els que es pretenen estudiar en aquest cas.

En base al coneixement acumulat al voltant de les poblacions del biofiltre percolador (Maestre *et al.*, 2010), s'esperava que els organismes de les mostres seqüenciades fossin majoritàriament d'origen procariòtic. En aquest sentit, el mode d'assemblatge configurat va consistir en el "*Genomic Project de novo assembly*", tot i ser mostres provinents de mRNA. Aquest mode d'assemblatge es basa en una anàlisi més simple de les lectures prevalent la reconstrucció de les seqüències resultants (d'ara en endavant "contigs"). Amb intenció de maximitzar la longitud i qualitat dels contigs assemblats es van realitzar quatre càlculs d'assemblatges diferents seguint el mode mencionat anteriorment. Cada grup de lectures classificades prèviament amb un mateix MID van ser processades en un mateix assemblatge, resultant-ne tres grups de contigs: un assemblatge de la zona alta, un de la zona mitja i un de la zona baixa del bioreactor. A més a més, es va realitzar un quart assemblatge conjunt a partir de la totalitat de lectures obtingudes en les tres mostres. Aquest darrer assemblatge de seqüències és va dur a terme en col·laboració amb el Dr. Roderic Guigó i el Dr. Pedro G. Ferreria del grup de Bioinformàtica i Genòmica del Centre de Regulació Genòmica (CRG) del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB).

5.4.2 CLASSIFICACIÓ, FILTRATGE I ANÀLISI

Com a primer processament d'anàlisi del metatranscriptoma del bioreactor es va procedir amb la classificació i el filtratge dels contigs generats en l'assemblatge conjunt de les lectures de piroseqüenciament. Els diferents procediments implementats en l'anàlisi de les seqüències resultants es van dur a terme mitjançant ordres de comanda basades en el sistema operatiu UNIX[®] (Ubuntu, GNU/Linux). Concretament, per a la identificació i classificació dels contigs es va utilitzar una estratègia informàtica desenvolupada pel Dr. Pedro G. Ferreria del CRG basada en el rastreig de cada lectura per determinar-ne l'origen de la mostra. A la figura 5.2 es mostra un esquema de l'estratègia realitzada, on cada contig del assemblatge conjunt és considerat susceptible d'haver estat seqüenciat a partir de les lectures de totes les mostres (zona alta, mitja i baixa). En base a aquesta consideració, la identificació es va realitzar retrocedint en l'assemblatge realitzat i rastrejant l'origen en els arxius previs.

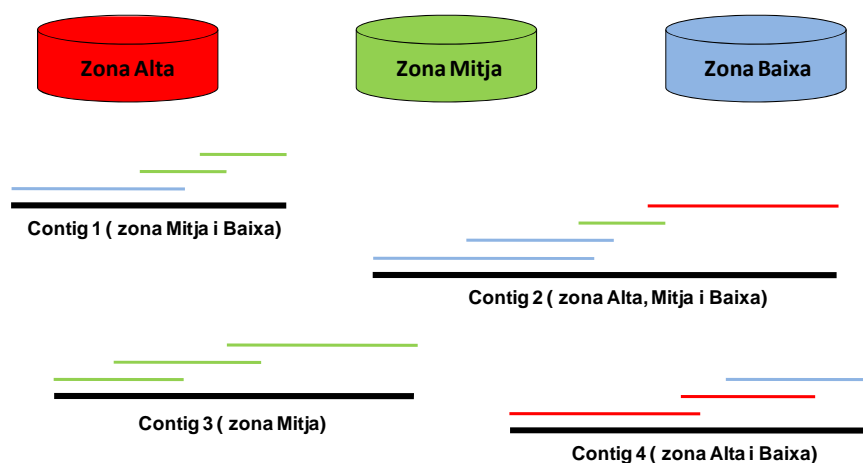


Figura 5.2 Esquema il·lustratiu del mètode de classificació dels contigs generats en funció de l'origen de la lectura. Per exemple, el *contig 1* és classificat com a present en les mostres de la zona mitja i de la zona baixa.

Paral·lelament a la classificació dels contigs resultants en funció de la seva localització en les mostres, es va realitzar una anàlisi similar en base a la freqüència de seqüenciament d'una determinada lectura que es localitza dins un contig (equivalent a un gen). Considerant una profunda i homogènia cobertura de piroseqüenciament, la quantificació del transcriptoma és relacionable amb la freqüència de seqüenciament de cada gen (Mortazavi *et al.*, 2008). En aquest sentit, amb l'objectiu de normalitzar i quantificar l'expressió de cada gen, es va utilitzar el paràmetre RPKM (*“Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads”*; equació 1). Aquesta, consisteix en una mesura de la densitat de lectura, i reflexa la concentració molar d'un transcrit en la mostra inicial a partir de la normalització de la longitud del RNA i del nombre total de lectures de l'estudi. Aquesta normalització facilita la comparació directa dels

nivells de transcripció tant dins una mateixa mostra, com entre mostres diferents (Mortazavi *et al.*, 2008).

$$RPKM = \frac{C \cdot R}{N \cdot L} \quad (1)$$

on *RPKM* és el valor d'estimació de l'expressió gènica; *C* és un valor constant (10⁹); *R* correspon al número de lectures (úniques) que es localitzen en el transcrit; *N* és el número de lectures de l'estudi i *L* és la longitud del transcrit.

Així doncs, segons els criteris de classificació definits com a fonaments de discussió i anàlisi de les dades de metatranscriptòmica, es van agrupar els contigs obtinguts en funció de l'origen de lectura per un costat, al mateix temps que es definia un rànquing d'expressió de cada contig, normalitzat i comparable entre les diferents zones del biofiltre. Finalment, amb intenció de centrar l'anàlisi del transcriptoma al voltant dels gens que mostraven un expressió diferencial més marcada en les diferents mostres del biofiltre, es va realitzar un filtratge multi-criteri del conjunt dels contigs obtinguts. De manera que els contigs amb una mitjana d'expressió (*RPKM*) superior a la mediana de *RPKM*'s totals, se'n van filtrar un 10%, concretament els que presentaven una major desviació estàndard relativa. Així doncs, segons el filtre aplicat en les classificacions de contigs realitzades, es va procedir amb l'anàlisi de les anotacions filogenètiques i funcionals dels contigs que presentaven un grau d'expressió més desigual entre les distintes zones del biofiltre estudiades.

5.4.3 ANOTACIÓ FILOGENÈTICA I FUNCIONAL

Amb la finalitat de determinar la funcionalitat associada i la similitud d'espècie, per a cada un dels contigs generats es va dur a terme una cerca amb el programa BLASTx, comparant els sis possibles marcs de lectura de les seqüències de nucleòtids contra la base de dades de seqüències proteiques no-redundants (NR) de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>; Altschul *et al.*, 1997). Tot i l'existència de treballs similars amb criteris de tall més relaxats (Urich *et al.*, 2008), es va definir un *e-value* màxim de 1x10⁻³ com a condició per a procedir amb la caracterització funcional. Per a cada contig implementat es va seleccionar la millor entrada (menor *e-value*) resultant de la base de dades de seqüències proteiques NR.

Paral·lelament a la cerca d'anotació funcional en la base de dades específica de proteïnes, es va sotmetre el conjunt de contigs obtinguts a una cerca per similitud amb el programa BLASTn contra la base de dades de SILVA (<http://www.arb-silva.de/>) específica per a la subunitat petita del rRNA (SSURef_106_NR). Al tractar-se de mostres per a l'estudi del metatranscriptoma, el

procediment metodològic realitzat perseguia l'eliminació dels rRNAs i tRNAs amb l'objectiu d'enriquir la mostra en mRNAs. En aquests sentit la cerca comparativa nucleòtid-nucleòtid, es va determinar amb uns criteris de tall més restrictius que en el cas de seqüències proteïques NR. Concretament pels resultats del BLASTn es va definir un *e-value* de 1×10^{-5} juntament amb una longitud mínima de similitud de 65 nt i una similitud mínima del 80% (Mou *et al.*, 2008).

La caracterització funcional de les seqüències es va realitzar amb el programa Blast2Go (Conesa *et al.*, 2005). Per a cada contig amb anotació funcional es va obtenir el nombre d'accés de la proteïna respectiva. Aquest va ser importat al programari permetent obtenir la informació referent a la caracterització de la proteïna i la descripció ontològica de la mateixa en base a les dades del projecte GO. Complementant la caracterització funcional amb el programa Blast2Go es va sotmetre el conjunt de seqüències a la base de dades del KEGG (Kanehisa *et al.*, 2011) amb intenció d'obtenir el mapa metabòlic de les seqüències anotades.

5.5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

5.5.1 ASSEMBLATGE DE SEQÜÈNCIES I CLASSIFICACIÓ

Els diferents assemblatges desenvolupats a partir de les seqüències crues obtingudes de la pròpia plataforma de seqüenciació van resultar en quatre projectes d'assemblatge genòmic *de novo*. Les característiques dels algorismes de càlcul configurats en l'assemblatge de les lectures van fer prevaler la reconstrucció de les seqüències resultants (contigs), obviant possibles reordenaments i maduracions post-transcripcionals, que no són habituals en procariotes. Una detallada descripció dels estadístics dels quatre projectes d'assemblatge desenvolupats es poden observar a la taula 5.1. Amb intenció de confirmar el millor assemblatge sobre el qual fonamentar la posterior anàlisi, es van comparar els valors estadístics de cada

Taula 5.1 Estadístics dels quatre assemblatges realitzats a partir de les lectures de piroseqüenciació.

Assemblatge	# lectures	# lectures assemblades completament	# lectures assemblades parcialment	N50 [▲]	# Contigs	Longitud mitja dels contigs	Longitud màxima de contig
Zona Alta	271.159	220.943	19.983	664	1923	615	3656
Zona Mitja	249.650	201.822	17.307	628	1978	589	2801
Zona Baixa	259.583	197.705	26.672	636	1570	593	2973
Conjunt	780.392	603.488	61.666	690	3181	623	3658

▲ valor estadístic, usat com a mesura de longitud mitjana d'un conjunt de seqüències nucleotídiques ordenades

projecte, a més de considerar la distribució de les longituds dels contigs resultants (fig. 5.3). Segons els resultats obtinguts, la configuració d'assemblatge més eficient va resultar ser el projecte d'assemblatge conjunt realitzat a partir de la totalitat de lectures obtingudes en les tres mostres. Malgrat que els projectes d'assemblatge individuals van assolir percentatges similars de lectures assemblades, l'assemblatge conjunt va resultar amb un 85.3% de les lectures assemblades mostrant una major qualitat dels contigs resultants. El valor estadístic N50 s'usa freqüentment en assemblatges genòmics i s'utilitza com una mesura de la longitud mitjana d'un conjunt de seqüències nucleotídiques.

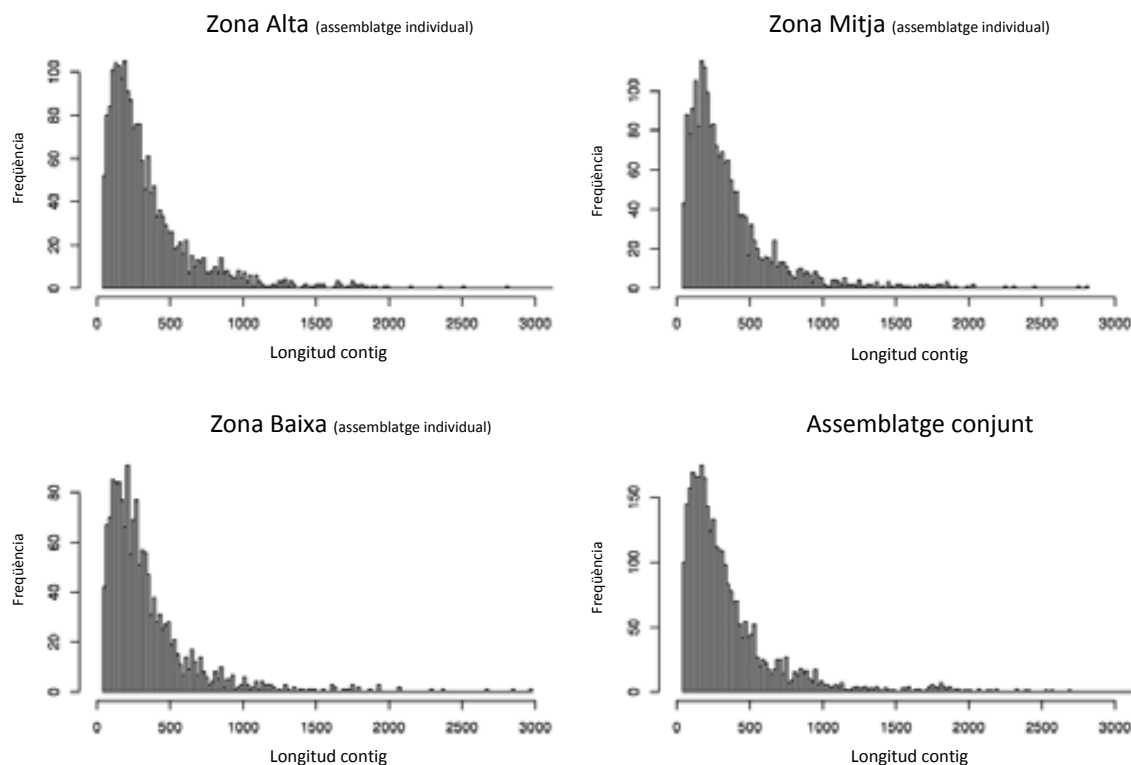


Figura 5.3 Distribucions de les longituds dels contigs obtinguts en cada un dels assemblatges experimentats.

Es calcula ordenant tots els contigs resultants de l'assemblatge de major a menor longitud, i es determina considerant el conjunt mínim de contigs amb una longitud del 50% dels contigs ordenats. Així doncs en base a la comparació dels estadístics N50, longituds mitjanes i número de contigs resultants, es va confirmar l'assemblatge conjunt com el millor projecte d'assemblatge per a les lectures de piroseqüenciament d'aquests estudi.

Fonamentant el posterior anàlisi metatranscriptòmic sobre l'assemblatge conjunt implementat es va procedir a la classificació inicial dels 3181 contigs resultants en funció de l'origen d'expressió. Mitjançant l'estratègia de rastreig de les diferents

lectures que localitzaven dins un determinat contig, es van catalogar les possibles procedències dels contigs obtinguts. La figura 5.4 mostra un diagrama de Venn on es recullen els 3181 contigs en funció de l'origen de seqüenciació. Segons l'exploració realitzada, el 82.1% dels contigs generats van aparèixer en les tres zones del biofiltre. Per altre costat, un 15.4% dels contigs obtinguts van ser identificats únicament en dues de les zones del bioreactor i per últim, només un 2.6% corresponien a específicament a una sola zona del bioreactor.

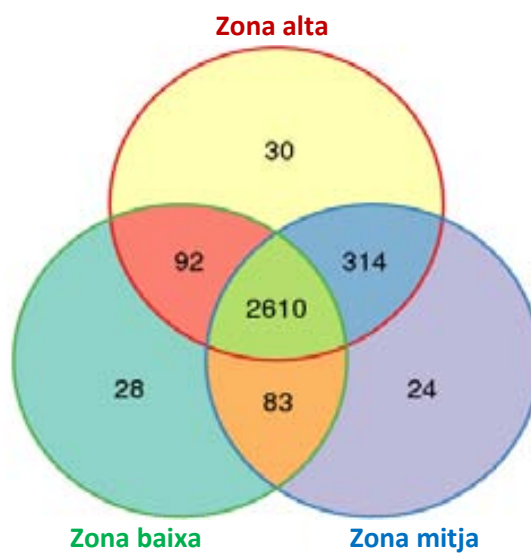


Figura 5.4 Número de contigs classificats específicament en funció de l'origen de la mostra seqüenciada.

D'aquesta manera, segons la classificació definida en funció de l'origen de la lectura es van organitzar set categories de contigs, estructurats en una base de dades accessible en línia (<http://familiapomodoro.cat/Rqr/>), a partir de la qual es va fonamentar l'anàlisi i discussió del metatranscriptoma obtingut per al biofiltre percolador.

5.5.2 GRAU D'EXPRESSION I EXPRESSION DIFERENCIAL

Paral·lelament a l'ordenació dels contigs en funció de l'origen de seqüenciació de les lectures es van normalitzar i quantificar els nivells d'expressió de cada contig en les diferents zones considerades. Mitjançant el càlcul dels RPKMs per a cada contig i de la zona de mostreig es van definir tres rànquings d'expressió en base als valors "rpkmUP", "rpkmMedium" i "rpkmLow" (consultar: <http://familiapomodoro.cat/Rqr/>). Les diferents mesures de RPKM, comparables entre si, van permetre quantificar els nivells d'expressió de cada un dels contigs en les respectives zones on havien estat classificats.

Amb intenció d'analitzar l'expressió diferencial del transcriptoma de les diferents zones del bioreactor, es van comparar els nivells d'expressió globals de les tres mostres. Mitjançant l'anàlisi estadística de la variable RPKM, referida a cada una de les zones del biofiltre (veure fig. 5.5), es van calcular les correlacions de Spearman per a cada una de les comparacions estadístiques possibles. A partir dels rànquings d'expressió generats per a cada zona del bioreactor, es determina el coeficient de Spearman com la correlació de rànquings entre dues de les mostres confrontades. Es va descartar la correlació de Pearson, basada en els valors absoluts de l'expressió de les mostres, ja que la correlació de Spearman és considerada un estadístic més robust i adequat per a aquesta tipologia d'anàlisi (Fierer et al., 2011). El seu valor oscil·la entre -1 i +1, i permet mesurar la relació directa entre dos variables aleatòries quantitatives.

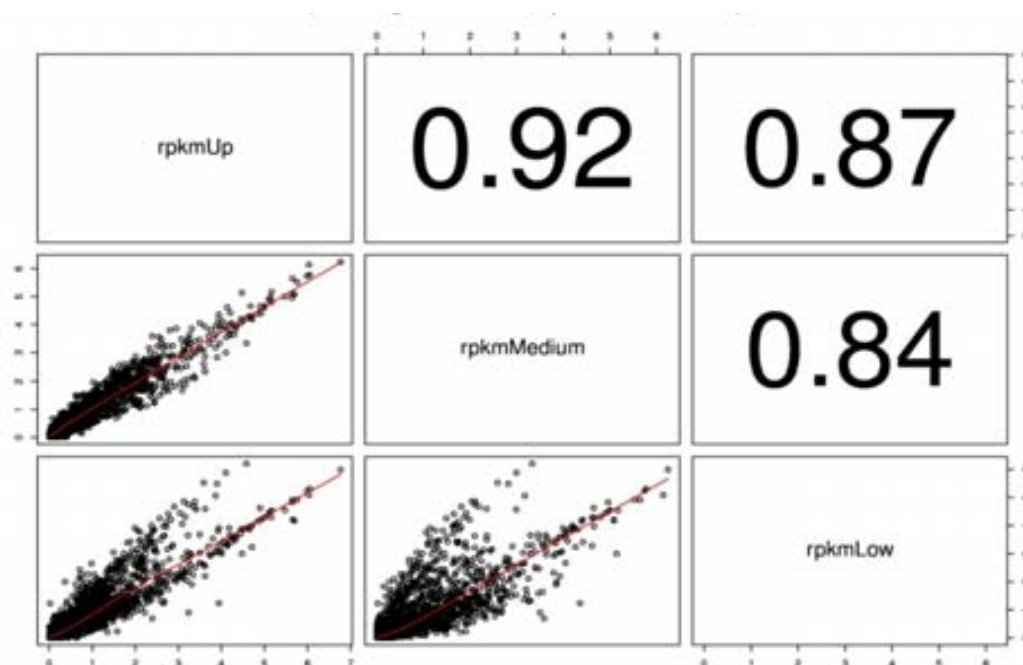


Figura 5.5 Comparativa de l'expressió global per parelles. Les tres gràfiques per punts mostren comparativament els valors respectius de RPKMs transformats en base el log2. Els valors presentats dins els requadres mostren la correlació de Spearman resultant entre les dos mostres comparades. A mode d'exemple, la zona alta (rpkmUp) amb la mostra mitja (rpkmMedium) presenten un valor de correlació de Spearman de 0.92 (diagonal superior) mentre la gràfica comparativa dels RPKMs d'aquestes zones es mostra en la diagonal inferior.

Tal i com es pot observar a la figura 5.5, com major desviació presenten els RPKMs (representats en punts negres) respecte la bisectriu, major resulta l'expressió diferencial entre les dues mostres comparades, i menor resulta el coeficient de correlació de Spearman calculat. En aquest sentit, segons les correlacions obtingudes, les mostres de la zona alta i mitja del reactor són les que van presentar comparativament un major coeficient de correlació de Spearman (0.92) indicant uns

nivells d'expressió globals més similars entre les dues mostres. La comparació estadística entre els rànquings d'expressió de les zones alta i baixa va resultar amb un coeficient de correlació de Spearman lleugerament inferior (0.87) senyalant un major grau de diferenciació entre ells. Finalment, les zones del biofiltre amb un coeficient de correlació de Spearman menor (0.84) i, per tant, amb uns transcriptomes més divergents entre si van resultar les mostres de la zona mitja i baixa del bioreactor.

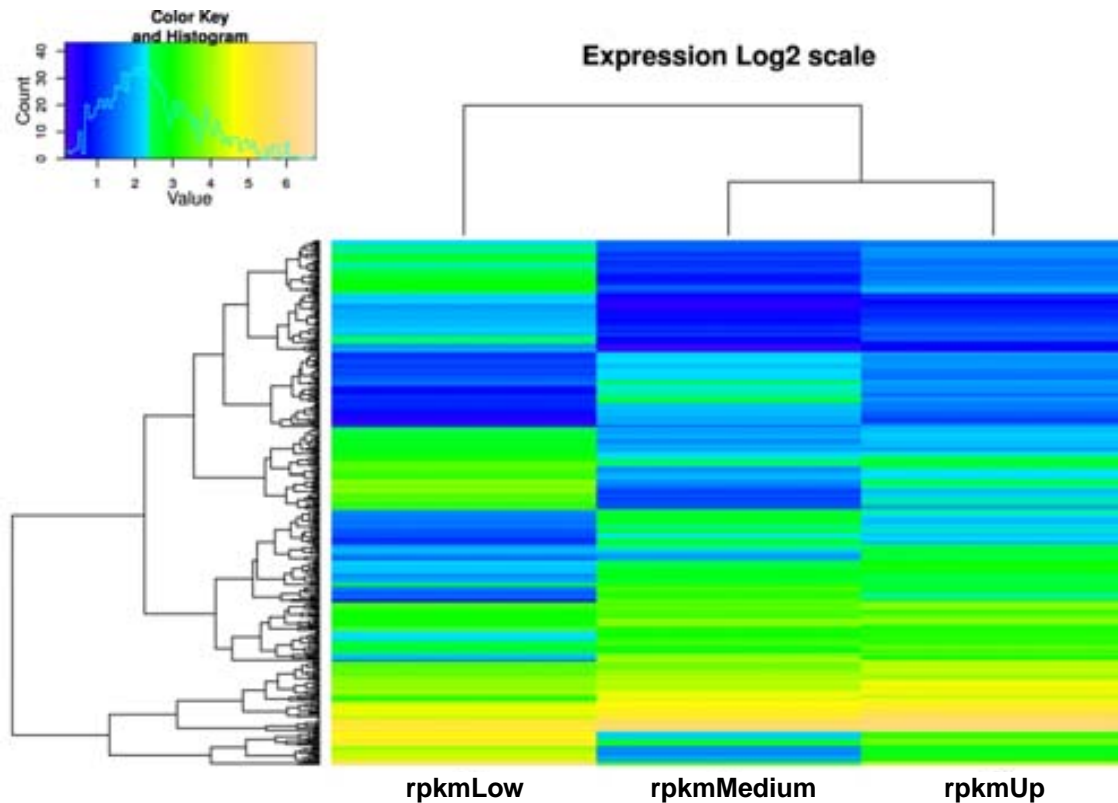


Figura 5.6 Mapa de calor de les tres zones del biofiltre considerades. Gràfic llegenda de la coloració a l'extrem superior esquerra. Els valors de coloració corresponen a la conversió dels RPKMs a l'escala $\log_2(1+x)$. Segons la gradació de color es representa el nivell d'expressió del conjunt de contigs en les tres mostres considerades, essent 0 el mínim grau d'expressió i 7 el màxim considerat. El dendrograma lateral representa la similitud de seqüència entre els contigs considerats, mentre que el dendrograma superior mostra la distància d'expressió global entre les tres mostres considerades: zona baixa (rpkmLow), zona mitja (rpkmMedium), zona alta (rpkmUp).

Complementant l'anàlisi estadística comparativa dels nivells d'expressió de les tres mostres considerades, a la figura 5.6 es mostren les agrupacions jeràrquiques de les diferents zones del biofiltre, així com un mapa de calor il·lustrant l'expressió de cada contig en la respectiva zona del bioreactor. En base a l'estudi de similitud de les seqüències obtingudes, les longituds representades en les branques dels dendrogrames reflecteixen les distàncies entre les diferents mostres i el conjunt de

contigs generats. Segons els dendrogrames calculats i en concordança amb els coeficients de correlació de Spearman presentats, les zones alta i mitja del biofiltre van presentar un major grau de similitud entre elles. En contraposició, tal i com es pot observar al dendrograma de la figura 5.6, la zona baixa del bioreactor va mostrar una expressió gènica més desigual front les altres zones del biofiltre. Així doncs, a partir de la classificació i anàlisi dels nivells d'expressió dels contigs obtinguts, es va observar clarament diferents perfils d'expressió entre les tres zones del biofiltre estudiades.

5.5.3 ANOTACIÓ I CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL

Del conjunt de contigs obtinguts en l'assemblatge realitzat, 2749 contigs, un 86.5% del total, van mostrar almenys una entrada en la cerca per similitud a la base de dades de seqüències proteiques NR (NCBI), d'aquests, només 2681 presentaven la puntuació mínima requerida segons el criteri de tall definit ($e\text{-value} \leq 1 \times 10^{-3}$). Per cada un d'aquests contigs es va seleccionar i anotar la millor entrada, a partir de la qual es va a procedir a l'anàlisi i caracterització funcional. La figura 5.7 recull les distribucions dels $e\text{-values}$ obtinguts per a les respectives entrades com a mesura de qualitat de les anotacions seleccionades. En aquest sentit, un 15.7% dels contigs assemblats inicialment no van ser considerats en l'anàlisi posterior degut a la puntuació obtinguda en l'anotació funcional. Respecte la cerca comparativa nucleòtid-nucleòtid realitzada paral·lelament en la base de dades específica de seqüències rRNA (SILVA), únicament 993 contigs van mostrar similitud de seqüència en aquesta base de dades, superant els criteris de tall definits. A partir de les anotacions obtingudes en ambdues bases de dades cercades es va complementar la informació disponible associada a cada contig (consultar: <http://familiapomodoro.cat/Rgr/>).

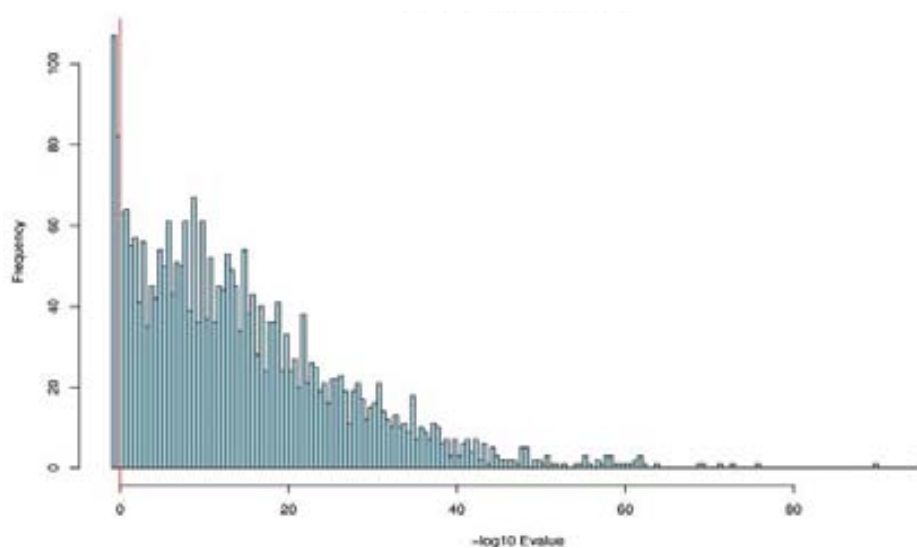


Figura 5.7 Distribució dels $e\text{-values}$ en l'escala $-\log_{10}$ dels millors resultats obtinguts en l'anotació funcional (BLASTx) pels 3181 contigs generats.

Amb intenció d'aprofundir en la caracterització funcional del metatranscriptoma es van sotmetre els 2681 contigs considerats al programa Blast2Go. Per a cada contig analitzat es va obtenir el nombre d'accés de la proteïna respectiva, permetent la caracterització i descripció ontològica d'aquesta.

En base a les categories ontològiques definides pel projecte GO, es van analitzar les possibles anotacions ontològiques per a cada proteïna, obtenint-se finalment 102 descripcions ontològiques en el global del metatranscriptoma. En les figures 5.8 i 5.9 es mostren les distribucions dels termes ontològics anotats en les categories GO, de processos biològics i funció molecular, respectivament. En el material suplementari (<http://familiapomodoro.cat/Rgr/>) es recullen els diferents termes ontològics anotats i els millor resultats de BLASTx recollits per a cada contig. En la mateixa base de dades generada pel metatranscriptoma es mostren els 30 enzims i mapes metabòlics resultants obtinguts a partir de l'exploració dels contigs en el projecte KEGG.

En consideració amb els resultats de BLASTx i la caracterització ontològica definida es va identificar la presència de proteïnes similars a hidrolases associades a la paret cel·lular de l'espècie *Burkholderia multivorans*. Aquesta espècie, relacionada amb infeccions oportunistes en pacients afectats per fibrosi quística i altres afectacions immunes (Turton *et al.*, 2003), és considerada un proteobacteri beta amb una gran versatilitat ambiental capaç de colonitzar una àmplia varietat de nínxols ecològics de sòls i aigües (Nishiyama *et al.*, 2010). No obstant, el seu interès biomèdic s'ha traduït en una gran quantitat d'estudis en els últims anys que han generat enormes quantitats d'informació de seqüències genòmiques i proteïques que podrien explicar la seva presència en la caracterització obtinguda segons les bases de dades consultades.

De manera similar, per a altres contigs es van identificar possibles proteïnes relacionades amb organismes eucariòtics superiors com per exemple *Rattus norvegicus* (rata gris), *Mus musculus* (ratolí comú), *Culex quinquefasciatus* (mosquit vector de la filariasis) i *Aedes aegypti* (mosquit vector de la febre groga i el dengue). Aquest fet va demostrar clarament la probable adjudicació errònia de certs resultats de BLASTx a una part dels contigs assemblats degut a la no existència d'anotació específica per a les seqüències obtingudes en l'anàlisi transcriptòmic realitzat en les bases de dades disponibles. En conseqüència, part de l'anotació funcional obtinguda en l'anàlisi probablement no va resultar fidedigne a la realitat funcional de la biomassa del bioreactor de dessulfuració.

No obstant, per altre costat es van descriure una important quantitat de contigs relacionats amb proteïnes potencials de microorganismes sulfur-oxidants. Alguns dels

contigs van aparèixer com a proteïnes específiques de *Thiobacillus denitrificans* i *Sulfurimonas denitrificans*, espècies anteriorment identificades en el biofiltre (Maestre *et al.*, 2010). A més, una gran varietat de proteïnes van mostrar afiliació a d'altres microorganismes sulfur-oxidants com *Acidithiobacillus*, diferents grups de *Chlorobi* (bacteris verds del Sofre) i una gran quantitat de clons no cultivables de bacteris sulfur-oxidants. També van aparèixer diversos contigs associats a proteïnes específiques de *Sulfuricurvum kujiense*, una nova espècie anaeròbia facultativa amb capacitat sulfur-oxidant aïllada de jaciments subterranis de petroli (Kodama i Watanabe, 2004). De manera similar, es van anotar diferents contigs relacionats amb proteïnes hipotètiques de les espècies *Sulfurihydrogenibium azorense* i *Sulfurihydrogenibium yellowstonense*, bacteris sulfur-oxidants en condicions de microaerofília aïllades de fonts termals de les illes Azores i del parc natural de Yellowstone, respectivament (Nakagawa *et al.*, 2005). A més, també es van identificar alguns contigs relacionats amb proteïnes específiques d'espècies del domini *Archaea* com per exemple *Sulfolobus solfataricus*, una espècie aeròbia d'origen volcànic capaç d'oxidar S⁰ en condicions extremes (She *et al.*, 2001). En contraposició al conjunt de contigs i proteïnes relacionades amb microorganismes sulfur-oxidants, es van identificar diverses proteïnes relacionades amb microorganismes sulfat-reductors, demostrant la coexistència de processos reductors de sofre en el global del bioprocés de dessulfuració de H₂S. En aquest sentit, diferents contigs van ser anotats com a hipotètiques proteïnes de diverses espècies de *Desulfovibrio* i clons no cultivables de *Desulfobacterium*.

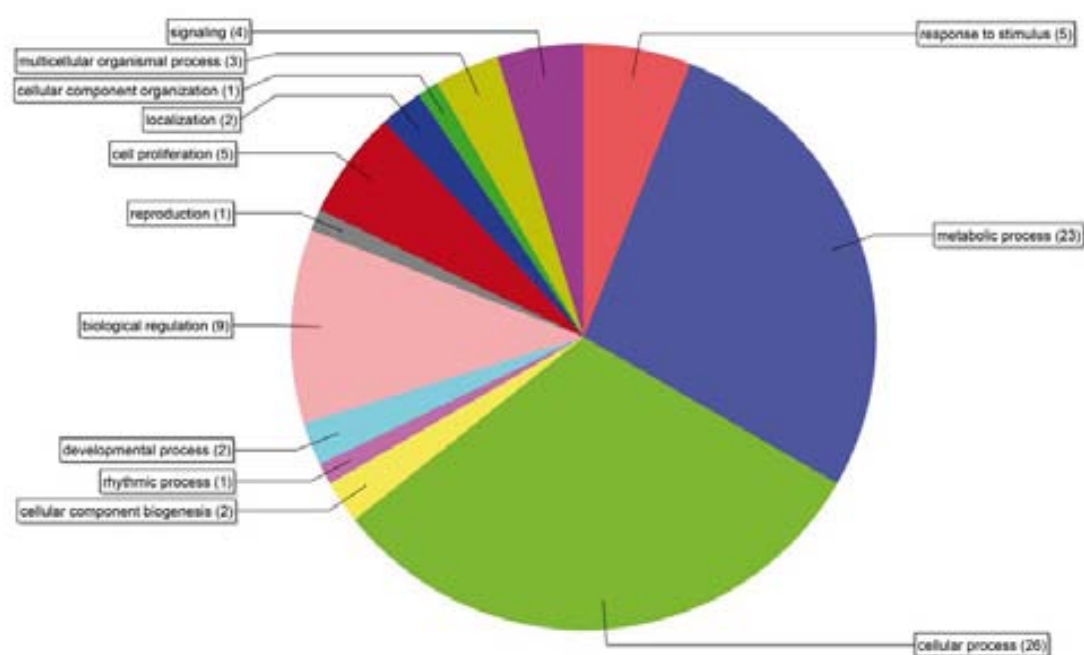


Figura 5.8 Distribució de les caracteritzacions ontològiques obtingudes en la categoria de processos biològics.

Així doncs, en una valoració global de l'anotació funcional obtinguda en el metatranscriptoma del bioreactor, es posa de manifest la manca d'informació biològica i de dades de seqüència disponibles al voltant de les comunitats que es desenvolupen en aquests sistemes. Tot i el creixent nombre de treballs de metagenòmica i metatranscriptòmica al voltant d'ecosistemes ambientals (Frias-Lopez *et al.*, 2008; Urich *et al.*, 2008; Poretsky *et al.*, 2009; Vila-Costa *et al.*, 2010), la gran diversitat d'estratègies metabòliques existents, forçades per la divergència evolutiva dels microorganismes amb capacitat sulfur-oxidant, fan d'aquesta habilitat energètica un metabolisme relativament divergent i desconegut entre les distintes espècies procarïotes. No obstant, històricament, s'han realitzats diversos treballs especialitzats al voltant del metabolisme sulfur-oxidant del *phylum Chlorobi* (bacteris verds del sofre), essent probablement el grup de microorganismes amb l'estratègia metabòlica sulfur-oxidant millor definida (Frigaard i Bryant, 2008; Stout *et al.*, 2008). Per altre costat, tot i ser estudiada amb menor grau, la sulfur-oxidació quimiòtrofa s'ha investigat tradicionalment al voltant d'espècies model com *Paracoccus pantotrophus* (Friedrich *et al.*, 2001; 2008), *Acidianus ambivalens* (Kletzin *et al.*, 2008) o diverses espècies de *Sulfolobus* (Bathe i Norris, 2007; Liu *et al.*, 2008). A partir dels respectius treballs s'han identificat diferents sistemes enzimàtics i proteïnes específiques involucrades en la sulfur-oxidació, tot i així cap d'elles ha estat anotada funcionalment en el metatranscriptoma del bioreactor.

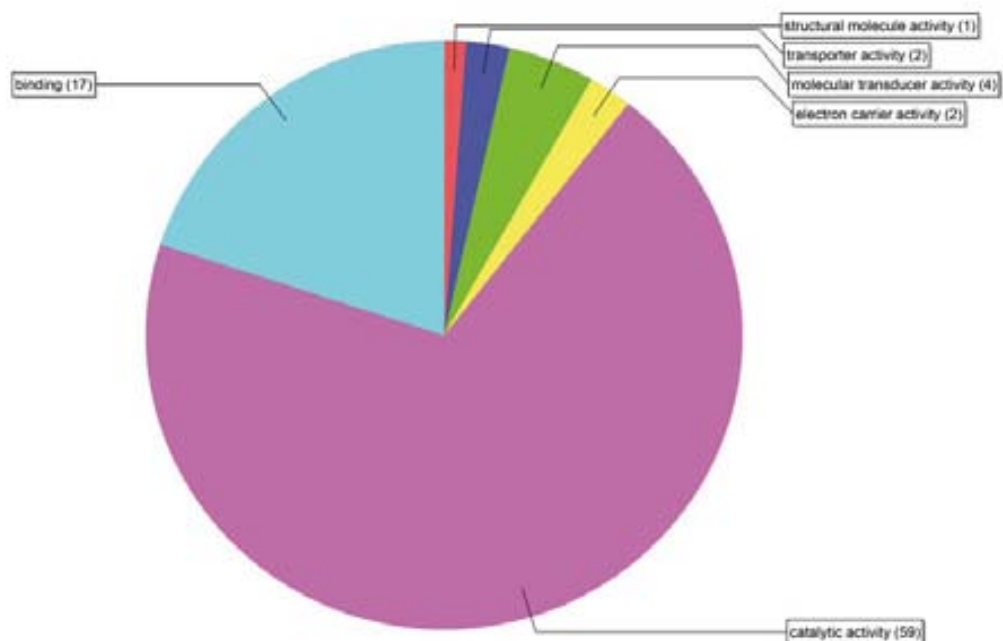


Figura 5.9 Distribució de les caracteritzacions ontològiques obtingudes en la categoria de funció molecular

Tot i l'anàlisi bioinformàtica implementada, existeixen diferents reptes i desafiaments associats a la interpretació dels patrons d'expressió gènica a nivell de comunitats complexes. Aspectes com la remarcable diversitat i complexitat de les comunitats microbianes de les mostres ambientals, així com l'escassa representació d'aquestes espècies en les bases de dades, són un notable desavantatge en l'anàlisi comprensiu de l'anotació funcional resultant (Frias-Lopez *et al.* 2008). A més d'aquests, altres factors intrínsecs a la metodologia d'obtenció, com poden ser el risc de degradació de les molècules de mRNA, els rendiments de síntesi i purificació del cDNA, o les condicions ambientals en el moment del mostreig poden influir i condicionar el metatranscriptoma final. Per altre banda, la longitud de les lectures de seqüenciació així com l'extensió dels gens diana i el mètode específic usat en la identificació i anotació de les lectures són altres variables influents en els resultats d'expressió gènica obtinguts (Urich *et al.*, 2008). Algunes d'aquestes variables poden ser controlades i millorades, en canvi d'altres són inherents a la metodologia o la especificitat de les comunitats mostrejades.

És reconegut i generalitzat el fet de que és més fàcil aconseguir una major i robusta quantitat d'informació i anotació per a les seqüències obtingudes com majors siguin les longituds de les lectures. En aquest sentit, la longitud mitja de les lectures de piroseqüenciació obtingudes en aquest estudi, va resultar major que en d'altres treballs de metatranscriptòmica desenvolupats (Frias-López *et al.*, 2008). A més, el procediment d'assemblatge de les seqüències va ser optimitzat per millorar la reconstrucció de les seqüències originals i així enriquir la identificació i anotació d'aquestes mitjançant les bases de dades disponibles. Tot i així, una part de les lectures de cDNA assemblades no van presentar resultats d'anotació de suficient qualitat, no només en les bases de dades de nucleòtids sinó tampoc en les específiques d'ontologia gènica o motius proteics. Aquesta manca d'anotació funcional, suggereix l'escàs coneixement existent de la diversitat metabòlica microbiana al voltant del metabolisme del sofre, i específicament al voltant de les estratègies quimiòtrofes de sulfur-oxidació. No obstant, la gran quantitat d'informació de seqüència generada en el present treball així com la quantificació dels nivells d'expressió i l'anàlisi de l'expressió diferencial, resulten una temptativa prometedora i reveladora d'aquesta estratègia energètica, focalitzada en els gens especialment actius de les complexes comunitats microbianes que es desenvolupen en el bioreactor de dessulfuració d'alta càrrega d'H₂S.

5.6 CONCLUSIONS

A partir de l'enorme quantitat de lectures de seqüenciació generades en el procediment metodològic desenvolupat en el capítol anterior s'ha definit l'estratègia d'assemblatge òptima per a l'estudi del metatranscriptoma del bioreactor de dessulfuració d'alta càrrega d'H₂S. Tot i ser un projecte de metatranscriptòmica, el càlcul d'assemblatge s'ha implementat exitosament segons un projecte genòmic *de novo*, prevalent la reconstrucció dels cDNA originals de forma similar al assemblatge d'un genoma. Segons el rastreig de l'origen de seqüenciació de cada lectura ha estat possible considerar independentment cada una de les zones del bioreactor malgrat haver realitzat un assemblatge conjunt de les lectures de piroseqüenciació. En base a aquesta classificació s'han pogut analitzar separatament els diferents contigs generats permetent l'estudi de l'expressió gènica en funció de la zona del bioreactor on havien estat identificats. El 82.1% dels contigs van ser identificats en les tres zones del biofiltre, mentre que un 15.4% dels contigs obtinguts van ser identificats únicament en dues de les zones del bioreactor, solament un 2.6% dels contigs van ser exclusius d'alguna zona específica del biofiltre.

L'enorme profunditat de seqüenciació de les mostres ha permès normalitzar i quantificar el nivell d'expressió de cada contig, generant un rànquing d'expressió per a cada zona del biofiltre. A partir d'aquestes quantificacions s'ha pogut valorar l'expressió diferencial de les comunitats microbianes en cada mostra, demostrant perfils d'expressió diferents, tant en composició com en abundància, per a cada zona del bioreactor. En aquest sentit es va observar com el metatranscriptoma de la zona baixa del biofiltre era el que presentava una expressió diferencial més marcada comparativament entre les tres zones del bioreactor considerades.

Segons els resultats de l'anotació i caracterització funcional obtinguda a partir de la recerca bioinformàtica en els diferents dipòsits públics de dades consultats, el 84.3% del total de contigs obtinguts van mostrar, segons els mínims de qualitats definits, alguna anotació funcional en la base de dades de seqüències proteiques NR. Paral·lelament, el 31.1% dels contigs totals assemblats van mostrar similitud de seqüència, segons els criteris de tall definits, amb alguna seqüència de la base de dades específica de rRNA. Ontològicament es van poder caracteritzar 102 contigs al voltant de categories ontològiques del projecte GO, i a partir d'aquests es van relacionar 30 contigs a diferents enzims i rutes metabòliques de la base de dades de KEGG. No obstant, la manca d'anotació funcional comprensible demostra l'escàs coneixement existent de la diversitat metabòlica microbiana al voltant de les diferents estratègies quimiòtrofes de sulfur-oxidació. En aquest sentit, l'enorme volum

d'informació de seqüència generada en aquest projecte de metatranscriptòmica es mostra com una descripció parcialment intel·ligible i entenedora de la realitat metabòlica de les comunitats microbianes que es desenvolupen en el bioreactor de dessulfuració d'alta càrrega d'H₂S. Al mateix temps, el conjunt d'informació de seqüència derivada i els perfils d'expressió obtinguts al llarg del bioreactor es mostren com un prometedori punt de partida en futurs treballs d'expressió gènica al voltant de la capacitat sulfur-oxidant.

5.7. REFERÈNCIES

- Altschul,S.F., Madden,T.L., Schäffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W., Lipman,D.J., (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research* 25, pp. 3389-3402.
- Ashburner,M., Ball,C.A., Blake,J.A., Botstein,D., Butler,H., Cherry,J.M., Davis,A.P., Dolinski,K., Dwight,S.S., Eppig,J.T., Harris,M.A., Hill,D.P., Issel-Tarver,L., Kasarskis,A., Lewis,S., Matese,J.C., Richardson,J.E., Ringwald,M., Rubin,G.M., Sherlock,G., (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology, *Nat Genet* 25, pp. 25-29.
- Audia,J.P., Patton,M.C., Winkler,H.H., (2008). DNA Microarray Analysis of the Heat Shock Transcriptome of the Obligate Intracytoplasmic Pathogen *Rickettsia prowazekii*, *Applied and Environmental Microbiology* 74, pp. 7809-7812.
- Bathe,S., Norris,P.R., (2007). Ferrous Iron- and Sulfur-Induced Genes in *Sulfolobus metallicus*, *Applied and Environmental Microbiology* 73, pp. 2491-2497.
- Bulow,S.E., Francis,C.A., Jackson,G.A., Ward,B.B., (2008). Sediment denitrifier community composition and *nirS* gene expression investigated with functional gene microarrays, *Environmental Microbiology* 10, pp. 3057-3069.
- Cardenas,E., Tiedje,J.M., (2008). New tools for discovering and characterizing microbial diversity, *Current Opinion in Biotechnology* 19, pp. 544-549.
- Conesa,A., Götz,S., García-Gómez,J.M., Terol,J., Talón,M., Robles,M., (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research, *Bioinformatics* 21, pp. 3674-3676.
- Darby,A.C., Hall,N., (2008). Fast forward genetics, *Nat Biotech* 26, pp. 1248-1249.
- Frias-Lopez,J., Shi,Y., Tyson,G.W., Coleman,M.L., Schuster,S.C., Chisholm,S.W., DeLong,E.F., (2008). Microbial community gene expression in ocean surface waters, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, pp. 3805-3810.
- Friedrich,C.G., Rother,D., Bardischewsky,F., Quentmeier,A., Fischer,J., (2001). Oxidation of Reduced Inorganic Sulfur Compounds by Bacteria: Emergence of a Common Mechanism?, *Applied and Environmental Microbiology* 67, pp. 2873-2882.
- Friedrich,C.G., Quentmeier,A., Bardischewsky,F., Rother,D., Orawski,G., Hellwig,P., Fischer,J., (2008). Redox Control of Chemotrophic Sulfur Oxidation of *Paracoccus pantotrophus* *Microbial Sulfur Metabolism*. In: C. Dahl and C. G. Friedrich (Eds.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 139-150.
- Fierer,N., Lauber,C.L., Ramirez,K.S., Zaneveld,J., Bradford,M.A., Knight,R., (2011). Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients, *ISME J.* pp.1751-7362
- Frigaard,N.U., Bryant,D.A., (2008). Genomic and Evolutionary Perspectives on Sulfur Metabolism in Green Sulfur Bacteria *Microbial Sulfur Metabolism*. In: C. Dahl and C. G. Friedrich (Eds.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 60-76.

- Gao,H., Yang,Z.K., Gentry,T.J., Wu,L., Schadt,C.W., Zhou,J., (2007). Microarray-Based Analysis of Microbial Community RNAs by Whole-Community RNA Amplification, *Applied and Environmental Microbiology* 73, pp. 563-571.
- Goecks,J., Nekrutenko,A., Taylor,J., The Galaxy Team, (2010). Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences, *Genome Biology* 11, p. R86.
- Gosalbes,M.J., Durbán,A., Pignatelli,M., Abellan,J.J., Jiménez-Hernández,N., Pérez-Cobas,A.E., Latorre,A., Moya,A., (2011). Metatranscriptomic Approach to Analyze the Functional Human Gut Microbiota, *PLoS ONE* 6, p. e17447.
- Hunter,S., Jones,P., Mitchell,A., Apweiler,R., Attwood,T.K., Bateman,A., Bernard,T., Binns,D., Bork,P., Burge,S., de Castro,E., Coggill,P., Corbett,M., Das,U., Daugherty,L., Duquenne,L., Finn,R.D., Fraser,M., Gough,J., Haft,D., Hulo,N., Kahn,D., Kelly,E., Letunic,I., Lonsdale,D., Lopez,R., Madera,M., Maslen,J., McAnulla,C., McDowall,J., McMenamin,C., Mi,H., Mutowo-Muellenet,P., Mulder,N., Natale,D., Orengo,C., Pesseat,S., Punta,M., Quinn,A.F., Rivoire,C., Sangrador-Vegas,A., Selengut,J.D., Sigrist,C.J.A., Scheremetjew,M., Tate,J., Thimmajananthan,M., Thomas,P.D., Wu,C.H., Yeats,C., Yong,S.Y., (2011). InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database, *Nucleic Acids Research* 40, p. D306-D312.
- Huson,D.H., Mitra,S., Ruscheweyh,H.J., Weber,N., Schuster,S.C., (2011). Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4, *Genome Research* 21, pp. 1552-1560.
- Ishii,N., Tomita,M., (2009). Multi-Omics Data-Driven Systems Biology of *E. coli*; *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli* In: S. Y. Lee (Eds.). Springer Netherlands, pp. 41-57.
- Kanehisa,M., Goto,S., Sato,Y., Furumichi,M., Tanabe,M., (2011). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets, *Nucleic Acids Research. Volume 40, Issue D1 Pp. D109-D114*
- Kletzin,A., (2008). Oxidation of Sulfur and Inorganic Sulfur Compounds in *Acidianus ambivalens* *Microbial Sulfur Metabolism*. In: C. Dahl and C. G. Friedrich (Eds.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 184-201.
- Kodama,Y., Watanabe,K., (2004). *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, pp. 2297-2300.
- Liu,Y., Zhou,J., Omelchenko,M.V., Beliaev,A.S., Venkateswaran,A., Stair,J., Wu,L., Thompson,D.K., Xu,D., Rogozin,I.B., Gaidamakova,E.K., Zhai,M., Makarova,K.S., Koonin,E.V., Daly,M.J., (2003). Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, pp. 4191-4196.
- Liu,S.J., (2008). Archaeal and Bacterial Sulfur Oxygenase-Reductases: Genetic Diversity and Physiological Function *Microbial Sulfur Metabolism*. In: C. Dahl and C. G. Friedrich (Eds.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 217-224.
- Maestre,J.P., Rovira,R., Álvarez-Hornos,F.J., Fortuny,M., Lafuente,J., Gamsans,X., Gabriel,D., (2010) Bacterial community analysis of a gas-phase biotrickling filter for biogas mimics desulfurization through the rRNA approach, *Chemosphere* 80, pp. 872-880.
- McLellan,S.L., Huse,S.M., Mueller-Spitz,S.R., Andreishcheva,E.N., Sogin,M.L., (2010). Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent, *Environmental Microbiology* 12, pp. 378-392.
- Mortazavi,A., Williams,B.A., McCue,K., Schaeffer,L., Wold,B., (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq, *Nat Meth* 5, pp. 621-628.
- Mou,X., Sun,S., Edwards,R.A., Hodson,R.E., Moran,M.A., (2008). Bacterial carbon processing by generalist species in the coastal ocean, *Nature* 451, pp. 708-711.
- Nakagawa,S., Shtaih,Z., Banta,A., Beveridge,T.J., Sako,Y., Reysenbach,A.L., (2005). *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* sp. nov., an extremely thermophilic, facultatively

- heterotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from Yellowstone National Park, and emended descriptions of the genus *Sulfurihydrogenibium*, *Sulfurihydrogenibium subterraneum* and *Sulfurihydrogenibium azorense*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, pp. 2263-2268.
- Nishiyama,E., Ohtsubo,Y., Nagata,Y., Tsuda,M., (2010). Identification of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 genes induced in soil environment by in vivo expression technology, *Environmental Microbiology* 12, pp. 2539-2558.
- Pagani,I., Liolios,K., Jansson,J., Chen,I.M., Smirnova,T., Nosrat,B., Markowitz,V.M., Kyripides,N.C., (2012). The Genomes OnLine Database (GOLD) v.4: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata, *Nucleic Acids Research* 40, p. D571-D579.
- Parro,V., Moreno-Paz,M., González-Toril,E., (2007). Analysis of environmental transcriptomes by DNA microarrays, *Environmental Microbiology* 9, pp. 453-464.
- Poretsky,R.S., Hewson,I., Sun,S., Allen,A.E., Zehr,J.P., Moran,M.A., (2009). Comparative day/night metatranscriptomic analysis of microbial communities in the North Pacific subtropical gyre, *Environmental Microbiology* 11, pp. 1358-1375.
- Sharan,R., Ideker,T., (2006). Modeling cellular machinery through biological network comparison, *Nat Biotech* 24, pp. 427-433.
- She,Q., Singh,R.K., Confalonieri,F., Zivanovic,Y., Allard,G., Awayez,M.J., Chan-Weiher,C.C.Y., Clausen,I.G., Curtis,B.A., De Moors,A., Erauso,G., Fletcher,C., Gordon,P.M.K., Heikamp-de Jong,I., Jeffries,A.C., Kozera,C.J., Medina,N., Peng,X., Thi-Ngoc,H.P., Redder,P., Schenk,M.E., Theriault,C., Tolstrup,N., Charlebois,R.L., Doolittle,W.F., Duguet,M., Gaasterland,T., Garrett,R.A., Ragan,M.A., Sensen,C.W., Van der Oost,J., (2001). The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, pp. 7835-7840.
- Sigrist,C.J.A., Cerutti,L., de Castro,E., Langendijk-Genevaux,P.S., Bulliard,V., Bairoch,A., Hulo,N., (2010). PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation, *Nucleic Acids Research* 38, p. D161-D166.
- Stewart FJ, Dmytrenko O, DeLong EF and Cavanaugh CM (2011) Metatranscriptomic analysis of sulfur oxidation genes in the endosymbiont of *Solemya velum*. *Front. Microbio.* 2:134. doi: 10.3389/fmicb.2011.00134.
- Stout,J., Smet,L., Vergauwen,B., Savvides,S., Beeumen,J., 2008. Structural Insights into Component SoxY of the Thiosulfate-Oxidizing Multienzyme System of *Chlorobaculum thiosulfatophilum* *Microbial Sulfur Metabolism*. In: C. Dahl and C. G. Friedrich (Eds.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 127-138.
- Tatusov,R., Fedorova,N., Jackson,J., Jacobs,A., Kiryutin,B., Koonin,E., Krylov,D., Mazumder,R., Mekhedov,S., Nikolskaya,A., Rao,B.S., Smirnov,S., Sverdlov,A., Vasudevan,S., Wolf,Y., Yin,J., Natale,D., (2003). The COG database: an updated version includes eukaryotes, *BMC Bioinformatics* 4, p. 41.
- Turton,J.F., Kaufmann,M.E., Mustafa,N., Kawa,S., Clode,F.E., Pitt,T.L., (2003). Molecular Comparison of Isolates of *Burkholderia multivorans* from Patients with Cystic Fibrosis in the United Kingdom, *Journal of Clinical Microbiology* 41, pp. 5750-5754.
- Urich,T., Lanzén,A., Qi,J., Huson,D.H., Schleper,C., Schuster,S.C., (2008). Simultaneous Assessment of Soil Microbial Community Structure and Function through Analysis of the Meta-Transcriptome, *PLoS ONE* 3, p. e2527.
- Vila-Costa,M., Rinta-Kanto,J.M., Sun,S., Sharma,S., Poretsky,R., Moran,M.A., (2010). Transcriptomic analysis of a marine bacterial community enriched with dimethylsulfoniopropionate, *The ISME Journal* (2010) 4, 1410-1420
- Walter,M.C., Rattei,T., Arnold,R., Güldener,U., Münsterkötter,M., Nenova,K., Kastenmüller,G., Tischler,P., Wölling,A., Volz,A., Pongratz,N., Jost,R., Mewes,H.W., Frishman,D., (2009). PEDANT covers all complete RefSeq genomes, *Nucleic Acids Research* 37, p. D408-D411.

- Ward,N., Fraser,C.M., (2005). How genomics has affected the concept of microbiology, *Current Opinion in Microbiology* 8, pp. 564-571.
- Weckx,S., Allemeersch,J., Van der Meulen,R., Vrancken,G., Huys,G., Vandamme,P., Van Hummelen,P., De Vuyst,L., (2011). Metatranscriptome Analysis for Insight into Whole-Ecosystem Gene Expression during Spontaneous Wheat and Spelt Sourdough Fermentations, *Appl. Environ. Microbiol.* 77, pp. 618-626.
- Ye,L., Shao,M.F., Zhang,T., Tong,A.H.Y., Lok,S., (2011). Analysis of the bacterial community in a laboratory-scale nitrification reactor and a wastewater treatment plant by 454-pyrosequencing, *Water Research* 45, pp. 4390-4398.
- Zhang,W., Li,F., Nie,L., (2010). Integrating multiple omics analysis for microbial biology: application and methodologies, *Microbiology* 156, pp. 287-301.

CAPÍTOL 6. CONCLUSIONS GENERALS I TREBALLS FUTURS

6.1 CONCLUSIONS GENERALS

De l'anàlisi i discussió dels resultats experimentals obtinguts segons els objectius de recerca definits inicialment se'n deriven les següents conclusions generals:

La inoculació del biofiltre amb fangs aerobis d'una planta de tractament d'aigües residuals ha permès una ràpida posada en marxa del biofiltre assolint, al cap de sis dies i de manera estable, RE superiors al 98% amb una càrrega d'entrada de $55.6 \text{ g H}_2\text{S m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. El seguiment de les variables operacionals monitorades han confirmat com a satisfactòria l'estratègia d'inoculació i posada en marxa del bioreactor amb el nou material de rebliment. No obstant, la utilització d'anelles Pall com a material de rebliment condiona els processos de transferència de matèria i d'hidrodinàmica durant l'operació, fet que ha influït en l'acumulació de S^0 al cos del biofiltre.

La operació del biofiltre a diferents ràtios $\text{O}_2/\text{H}_2\text{S}$, així com a diferents velocitats de percolació de la fase líquida ha permès definir la relació existent per aquesta configuració entre la càrrega d'oxigen aportada al sistema i la selectivitat en la producció de S elemental i SO_4^{2-} com productes d'oxidació d' H_2S . Així doncs, les anelles Pall resulten ser un material de rebliment efectiu per a la dessulfuració d'altres càrregues d' H_2S , tot i que requereix una notable aportació d'oxigen al sistema ($1.7 \text{ mg O}_2 \text{ min}^{-1}$) per tal de dur a terme una oxidació completa fins a SO_4^{2-} . Els resultats de les experimentacions desenvolupades mostren la versatilitat i l'adaptació del biofiltre a les configuracions canviants sense que es vegi afectada la seva capacitat d'eliminació.

Per altre banda, el clonatge i seqüenciació dels gens 16S rRNA ha permès identificar en primer terme la diversitat filogenètica existent de les comunitats microbianes desenvolupades en el bioreactor de dessulfuració d'alta càrrega d' H_2S . S'han identificat i seleccionat algunes de les espècies sulfur-oxidants rellevants en el procés de dessulfuració sota les condicions d'operació del bioreactor. En base a aquesta informació, i en una nova posada en marxa del sistema, s'ha realitzat un seguiment d'aquestes poblacions sulfur-oxidants mitjançant la tècnica FISH. En aquest sentit, s'ha observat una dinàmica de poblacions significativament diferent al llarg del temps entre les tres zones del biofiltre considerades. De manera que s'ha relacionat la predominança d'algunes espècies en determinades zones del bioreactor amb les condicions operacionals del biofiltre.

Malgrat la inversió de temps necessària pel desenvolupament d'aquestes tècniques, tant el clonatge i seqüenciació com la tècnica FISH han demostrat ser unes aproximacions adequades per a l'estudi de les comunitats microbiològiques que es desenvolupen en un bioreactor de dessulfuració d'alta càrrega d' H_2S .

Respecte al desenvolupament metodològic per a l'estudi del metatranscriptoma del biofiltre percolador tractant altes càrregues d'H₂S, s'han optimitzat i definit experimentalment els procediments necessaris a implementar per a obtenir el metatranscriptoma del bioprocés. Experimentant diferents mètodes d'extracció i purificació, s'han assolit els requeriments quantitius i qualitius de mRNA necessaris per a la generació de les llibreries de cDNA. El mètode de preparació de les llibreries de cDNA a partir del mRNA obtingut del biofiltre ha estat adaptat i configurat específicament per a la tipologia de mostres de l'estudi. Dos dels procediments de preparació de les llibreries de cDNA definits comercialment, l'etapa inicial de fragmentació del RNA i la d'eliminació de petits fragments de mRNA, no han estat implementats en la metodologia final definida. De manera similar, ha estat necessari ajustar les metodologies de purificació de les llibreries de cDNA per a la realització de l'anàlisi de la diversitat d'organismes procariotes presents en les mostres plantejats en aquest treball.

Amb el procediment desenvolupat s'ha demostrat la possibilitat d'obtenir el metatranscriptoma d'un bioprocés industrial així com l'ús de les plataformes de seqüenciació massiva en noves disciplines com la biotecnologia ambiental. A partir de l'enorme quantitat de lectures de seqüenciació generades s'ha definit l'estratègia d'assemblatge òptima per a l'estudi metatranscriptòmic. Segons el rastreig de l'origen de seqüenciació de cada lectura ha estat possible considerar independentment cada una de les zones del bioreactor. El 82.1% dels contigs han estat identificats en les tres zones del biofiltre, mentre que un 15.4% han estat identificats únicament en dues de les zones del bioreactor i solament un 2.6% són exclusius d'alguna zona específica del biofiltre.

L'enorme profunditat de seqüenciació de les mostres ha permès normalitzar i quantificar el nivell d'expressió de cada contig, generant un rànquing d'expressió per a cada zona del biofiltre. En aquest sentit s'ha observat una expressió diferencial evident entre les tres zones del bioreactor considerades, resultant la zona baixa del bioreactor com la biomassa que presenta un patró d'expressió gènica més diferent. Segons els resultats de l'anotació i caracterització funcional obtinguda a partir de la recerca bioinformàtica en els diferents dipòsits públics de dades consultats, el 84.3% del total de contigs obtinguts han estat anotats funcionalment en la base de dades de seqüències proteiques NR. Paral·lelament, el 31.1% dels contigs totals assemblats mostren similitud de seqüència amb alguna seqüència de la base de dades específica de rRNA. No obstant, la manca d'anotació funcional comprensible demostra l'escàs coneixement existent de la diversitat metabòlica microbiana al voltant de les diferents estratègies quimiòtrofes de sulfur-oxidació. En aquest sentit,

l'enorme volum d'informació de seqüència generada en aquest projecte de metatranscriptòmica es mostra com una descripció parcialment intel·ligible i entenedora de la realitat metabòlica de les comunitats microbianes que es desenvolupen en el bioreactor de dessulfuració d'alta càrrega d'H₂S

6.3 TREBALLS FUTURS

A partir del coneixement acumulat al voltant de la dessulfuració d'alta càrrega d'H₂S seria interessant experimentar noves configuracions del biofiltre percolador. En aquest sentit, es podria plantejar la modificació del sentit de percolació de la fase líquida per tal d'optimitzar l'aportació d'oxigen a les comunitats microbianes. L'actual configuració a contracorrent, implica l'existència de diversos gradients verticals tant a la fase líquida (O₂) com a la fase gas (H₂S), de manera que les zones més baixes del bioreactor són les que presenten una major concentració d'H₂S amb una menor disponibilitat d'O₂. Configurant una entrada i sortida paral·lela de la fase gas i la fase líquida s'aconseguiria optimitzar la disponibilitat d'O₂ a les zones del biofiltre on la concentració d'H₂S és màxima. D'aquesta manera probablement es minimitzaria la producció de S⁰ al cos del bioreactor repercutint en un millor i robust funcionament del biofiltre en llargs períodes operacionals.

Com a conseqüència del canvi configuracional plantejat, segurament l'adaptació i evolució de les comunitats microbianes en el cos del biofiltre resultaria diferent a l'operació estudiada en aquesta tesi. Per això seria interessant realitzar nous estudis periòdics de les comunitats microbianes que es desenvolupen al llarg de l'operació. Una possible tècnica per a la identificació i quantificació de les espècies presents seria la tècnica FISH, especialment per a espècies concretes. No obstant una aproximació més global i adequada en l'estudi de la diversitat filogenètica existent seria l'aplicació de les noves plataformes de seqüenciació massiva per a la seqüenciació directa de marcadors filogenètics com els gens 16S rRNA. La disponibilitat i rapidesa d'aquestes tecnologies juntament amb la profunditat de seqüenciació que ofereixen, permeten plantejar estudis de caracterització i quantificació d'una manera ràpida, econòmica i integral.

Per altre costat el conjunt d'informació de seqüència derivada i els perfils d'expressió gènica obtinguts en l'estudi de metatranscriptòmica realitzat, es mostren com un prometedor punt de partida en futurs treballs d'expressió gènica al voltant de la capacitat sulfur-oxidant. Així doncs, part de la informació de seqüència obtinguda en les diferents zones del biofiltre permeten planificar nous treballs específics focalitzant l'estudi en aquells contigs amb interès. Paral·lelament, seria interessant analitzar més

profundament els perfils d'expressió de cada una de les zones considerades, centrant l'anàlisi en aquells contigs que mostrin una expressió diferencial més marcada, per tal d'incidir en aquells gens més lligats a les condicions ambientals del bioreactor. Malgrat l'ambigüitat de les diferents estratègies quimiòtrofes de sulfur-oxidació, el conjunt d'informació de seqüència del metatranscriptoma apareix com un bon model específic d'ambients sulfurosos, de manera que en futurs estudis es disposarà del conjunt de seqüències obtingudes d'aquest nínxol com un treball significatiu de la funcionalitat d'aquestes comunitats sulfur-oxidants.

ANNEX

ANNEX

NOMENCLATURA I ACRÒNIMS:

AN: síntesi per addició de nucleòtid
DGGE: electroforesi en gel amb gradient desnaturalitzant
DNA: àcid desoxiribonucleic
cDNA: DNA complementari
dscDNA: cDNA de doble cadena
dNTP: desoxirribonucleòtids trifosfat
EBRT: temps de residència del gas en llit buit
EC: capacitat d'eliminació
FIA: Flow Injection Analysis
FISH: hibridació in situ per fluorescència
HRT: temps mig de retenció hidràulic del líquid
ISR: regió espaiadora intergènica
LO₂: càrrega d'oxigen
MM: medi mineral
OD: oxigen dissolt
ORF: marc obert de lectura
ORP: potencial d'oxido-reducció
OTU: unitat taxonòmica operacional
PFA: paraformaldehid
PLFA: anàlisi dels àcids grassos dels fosfolípids
PCR: reacció en cadena de la polimerasa
PP_i: pirofosfat inorgànic
ppm_v: parts per milió en volum
PTP: placa de piroseqüenciació (Pico Titer Plate)
TDS: sulfurs dissolts totals
TLV: velocitat de percolació del líquid
TRFLP: polimorfisme de longitud del fragment de restricció terminal
RE: eficàcia d'eliminació
RNA: àcid ribonucleic
mRNA: RNA missatger
rRNA: RNA ribosòmic

tRNA: RNA de transferència

RNasa: ribonucleasa

RT-PCR: reacció en cadena de la polimerasa de transcripció inversa

SBL: seqüenciació per lligació

SDS: dodecilsulfat sòdic

SSU: subunitat petita

SSV: sòlids en suspensió volàtils

STR: seqüenciació a temps real

TCR: terminació cíclica reversible

MEDIS DEL PROCEDIMENT DE CLONATGE

○ **Medi SOB**

0.5% Extracte de llevat

2% Triptona

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Glucosa

○ **Medi LB**

5g Extracte de llevat

10g Triptona

10g NaCl

ddH₂O fins 1 litre

Ajustar el pH a 7.0 i autoclavar

MATERIAL SUPLEMENTARI:

<http://familiapomodoro.cat/Rgr/>

HIBRIDACIÓ *IN SITU* PER FLUORESCÈNCIA PER A LA VISUALITZACIÓ DIRECTA DE MICROORGANISMES

Solucions necessàries:

- **Solució tampó fosfat salina (PBS). 30xPBS (0.3M P-PO₄³⁻)**

Per a pH=7.2, la relació disòdic:fosfats de sodi ha de ser 7.2:2.8

Per 1L de solució: 77.37 g de Na₂HPO₄·12H₂O; concentració final: 0.216 M

13.1 g of NaH₂PO₄·2H₂O; concentració final: 0.084 M

226.2 g NaCl; concentració final: 3.9 M

- **Solució tampó fosfat salina (PBS). 3xPBS (0.03M P-PO₄³⁻)**

Diluir 50 mL de 30xPBS en 500 mL d'aigua MilliQ. Autoclavar i emmagatzemar a temperatura ambient.

- **Solució tampó fosfat salina (PBS), solució de treball. 1xPBS (0.01M P-PO₄³⁻)**

Diluir 16.7 mL de 30xPBS en 500 mL d'aigua MilliQ. Autoclavar i emmagatzemar a temperatura ambient.

- **Paraformaldehyd (4% PFA)**

Escalfar 65 mL d'aigua MilliQ (≈ 60°C) dins una campana extractora. Afegir 4 g de paraformaldehyd. Posteriorment afegir NaOH 2 M gota a gota al mateix temps que s'agita, fins que la solució es clarifica (1-2 min.). Treure la solució de la font de calor i afegir 33 mL de 3xPBS. Ajustar el pH a 7.2 amb HCl. Eliminar qualsevol cristal·litació romanent en la solució per filtració en condicions estèrils (0.2 µm). Refrigerar ràpidament la solució a 4°C i emmagatzemar-la a aquesta temperatura per a períodes de fins a 2 dies. Per a períodes més llargs aliquotar en tubs eppendorfs de 2 mL i guardar a -20°C.

- **1M Tris-HCl, pH 7.2**

Dissoldre 121,1 g de Tris en 800 ml d'aigua MilliQ. Afegir 42 mL d'HCl concentrat. Deixar refredar fins a temperatura ambient. Posteriorment ajustar el pH i enrasar fins a 1 L amb aigua MilliQ. Autoclavar i guardar a temperatura ambient.

Alternativament: Dissoldre 157.6 g de TrisHCl (C₄H₁₁NO₃·HCl) en 800 mL d'aigua MilliQ. Ajustar el pH i enrasar fins a 1L amb aigua MilliQ. Autoclavar i guardar a temperatura ambient.

- **5M NaCl**

Dissoldre 292.2 g de NaCl en 800 mL d'aigua MilliQ. Enrasar fins a 1 L amb aigua MilliQ. Autoclavar i guardar a temperatura ambient.

- **Formamida**

Formamida desionitzada. Emmagatzemar a 4°C i usar seguidament després d'obrir l'ampolla. Alternativament: guardar en alíquotes de 2 mL a -20°C.

Perill: La formamida és molt tòxica. Manipular amb guants i dins de la campana extractora. Gestió adequada dels residus generats.

○ **H₂O destil·lada estèril**

Autoclavar aigua MilliQ. Guardar a temperatura ambient.

○ **Dodecilsulfat sòdic (10% SDS)**

Escalfar 50 g de SDS (dodecil sulfat sòdic, qualitat-electroforesis) en 450 mL d'aigua MilliQ a 68°C. Ajustar el pH amb HCl concentrat fins a 7.2. Enrasar el volum fins a 500 mL. No és necessària esterilització posterior.

Perill: utilitzar màscara durant les pesades de SDS.

○ **0.5M EDTA**

Dissoldre 18.6 g d'EDTA en 80 mL d'aigua MilliQ ajustant el pH a 8.0 (aproximadament 2 g de NaOH seran necessaris). Enrasar fins a 100 mL. Autoclavar i guardar a temperatura ambient.

○ **Etanol**

Emmagatzemar 100 mL d'etanol 96% a -20°C.

Taula a Taula de concentracions de Formamida, NaCl i EDTA per a les solucions d'hibridació i de rentat, necessàries pel protocol de d'hibridació *in situ* per fluorescència

Solució d'hibridació		Solució rentadora			
Concentració final de Formamida (%)	Formamida (µL) ⁽¹⁾	Concentració final de NaCl (mM)	5M NaCl (µL) ⁽³⁾	Concentració final de EDTA (mM) ⁽²⁾	0.5M EDTA (µL) ⁽³⁾
0	0	900	9000	-	-
5	100	630	6300	-	-
10	200	450	4500	-	-
15	300	318	3180	-	-
20	400	215	2150	5	500
25	500	149	1490	5	500
30	600	102	1020	5	500
35	700	70	700	5	500
40	800	46	460	5	500
45	900	30	300	5	500
50	1000	18	180	5	500
55	1100	10	100	5	500
60	1200	4	40	5	500
65	1300	- ⁽⁴⁾	- ⁽⁴⁾	5	500
70	1400	- ⁽⁴⁾	- ⁽⁴⁾	3.5	350
75	1500	- ⁽⁴⁾	- ⁽⁴⁾	2.5	250
80	1600	- ⁽⁴⁾	- ⁽⁴⁾	1.75	175

(1) Volum per preparar 2 mL de tampó d'hibridació.

(2) EDTA s'afegeix com a agent quelant per evitar la influència de dications

(3) Volums per preparar 50 mL de solució rentadora.

(4) Suficients cations Na⁺ amb l'EDTA afegit.

