

# Composición y distribución de la comunidad microbiana en gránulos flotantes de un reactor anaeróbico de fango granular

**Autores:** Oriol Canals<sup>1</sup>, Ana Corral<sup>2</sup>, Juan Ramón Ortiz<sup>3</sup>, Jiri Snaidr<sup>4</sup>, Meritxell Mas<sup>1</sup>

1. Hydrolab Microbiologica, L'Hospitalet de Llobregat, SPAIN (ocanalsd@gmail.com; mmas@hydrolab.es)

2. Cadagua, Sant Cugat del Vallès, SPAIN (acorral@ferrovial.com)

3. MicroPlanet Laboratorios, Sant Cugat del Vallès, SPAIN (jortiz@microplanet-psl.com)

4. Vermicon AG, Munich, DEUTSCHLAND (info@vermicon.com)

**Palabras Clave:** fango granular; digestión anaerobia; FISH; VIT®; arqueas metanogénicas; eubacterias.

## Resumen

Se ha analizado, mediante FISH y tecnología VIT®, la composición de la comunidad procariota de las capas interna y externa de los gránulos flotantes del reactor anaerobio de la EDAR de Cobega Martorelles.

La parte externa ha presentado mayor abundancia y actividad procariota, con dominancia de las arqueas metanogénicas. Los Fimicutes, implicados en las etapas de hidrólisis y acidogénesis del proceso de digestión anaerobia, han dominado en la zona interna.

Una elevada actividad de dichas eubacterias podría implicar una producción suficiente de sustratos en el interior de los gránulos que permitiría la realización completa del proceso de digestión anaerobia y consecuente acumulación de biogás, incrementando la probabilidad de flotación de los gránulos.

## 1. Introducción

Entre las diferentes tecnologías que actualmente se aplican en los procesos de tratamiento de aguas residuales destaca la tecnología de fango granular. Esta tecnología se caracteriza por presentar la biomasa formando conglomerados de una estructura densa y apariencia bien definida denominados gránulos (Schmidt and Ahring 1995). Los sistemas que utilizan fango granular presentan, en comparación con otras tecnologías donde la biomasa se encuentra de forma dispersa como los fangos activos, una mayor facilidad en el proceso de separación líquido-sólido debido a que no existe “mezcla” entre la biomasa y el líquido circundante. Aun así, la mayoría de sistemas de tratamiento con tecnología de fango granular requieren igualmente de una buena velocidad de sedimentación de los gránulos para asegurar un correcto funcionamiento del proceso. En este sentido, la presencia de gránulos flotantes puede presentar un problema e interferir en la obtención de un efluente de calidad debido a la pérdida de biomasa.

El fango granular, aunque es usado en una gran variedad de sistemas de tratamiento, ha adquirido especial relevancia en los sistemas de digestión anaerobia, tanto de tratamiento de aguas residuales como de digestión de fangos. La composición y distribución de la comunidad procariota (Eubacteria y Archaea) en los sistemas

anaerobios ha sido ampliamente estudiada, tanto mediante el uso de técnicas de hibridación in situ (Fluorescence In Situ Hybridization, o FISH) como mediante las más novedosas técnicas de secuenciación masiva o metagenómica (Ariesyday et al. 2007; Calli et al. 2003; Calli et al. 2006; Chouari et al. 2005; McMahon et al. 2004; Narihiro et al. 2015; Roest et al. 2005). Existe menos información en relación a la composición y distribución de la comunidad procariota específica de sistemas anaerobios que operan con fango granular (Batstone et al. 2004; Díaz et al. 2006; Liu et al. 2002; Narihiro et al. 2009; Tagawa et al. 2000) y aún más escasa es la información existente sobre la composición de los gránulos flotantes de estos sistemas (Saiki et al. 2002), así como sobre las causas de su flotación.

En este contexto, el objetivo del presente artículo es el estudio de la composición y distribución de la comunidad microbiana (Eubacteria y Archaea) en los gránulos flotantes de un reactor anaerobio de Circulación Interna de tratamiento de vertidos derivados de bebidas carbonatadas.

## 2. El proceso de digestión anaerobia

El proceso de digestión anaerobia puede ser descrito como el conjunto de reacciones químicas a través de las cuales la materia orgánica es convertida a dióxido de carbono y

metano mediante el metabolismo de los microorganismos anaeróbicos. El proceso de digestión anaerobia está compuesta por cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

Debido a que la mayor parte de la materia orgánica se encuentra en forma de polímeros orgánicos de gran tamaño no utilizables para la mayoría de bacterias anaerobias, el primer paso de la digestión anaerobia consiste en la partición de estas cadenas largas en moléculas de menor tamaño (monómeros), etapa conocida como hidrólisis. Mediante la hidrólisis, las moléculas orgánicas complejas se transforman en azúcares simples, aminoácidos y ácidos grasos. Algunos compuestos producidos en esta primera etapa, como el acetato, pueden ser usados directamente por las arqueas metanogénicas durante la etapa final de metanogénesis, aunque otras moléculas de longitud de cadena mayor a la del acetato, como los ácidos grasos volátiles, deben ser metabolizados en etapas intermedias para que puedan ser usados por las arqueas metanogénicas. Hasta el momento, los grupos bacterianos de los que se conocen su implicación en la etapa de hidrólisis corresponden principalmente al grupo de los Firmicutes, Chloroflexi y del Subfilo Cytophaga-Flexibacter.

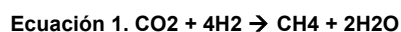
La segunda etapa, conocida como acidogénesis, consiste en una mayor degradación y partición de los componentes restantes de la

etapa de hidrólisis. Este paso lo llevan a cabo bacterias acidogénicas o fermentativas (primordialmente del grupo de los Firmicutes y de las Actinobacteria), y consiste en la transformación de los monómeros simples obtenidos durante la etapa de hidrólisis principalmente a ácidos grasos volátiles. En esta etapa se forman también otros productos característicos de un sistema de digestión anaerobia, como el amoníaco y el dióxido de carbono, entre otros.

La tercera etapa, o acetogénesis, es el proceso a través del cual las bacterias acetógenas (principalmente pertenecientes al grupo de las Deltaproteobacteria) producen acetato, el sustrato sobre el que se sustenta la etapa final de la digestión anaerobia o metanogénesis.

En la última etapa o metanogénesis, las arqueas metanogénicas usan los sustratos orgánicos sencillos junto con el hidrógeno y el dióxido de carbono generados en las etapas anteriores y los convierten en metano, dióxido de carbono y agua, componentes mayoritarios del biogás. Existen dos rutas metabólicas para la formación de metano: la metanogénesis hidrogenotrófica (ecuación 1) y metanogénesis acetoclástica (ecuación 2). La metanogénesis hidrogenotrófica, o dependiente de hidrógeno, consiste en la reducción del dióxido de carbono consumiendo moléculas de hidrógeno en el proceso, produciendo metano y agua como

productos finales de la reacción. Por otro lado, la metanogénesis acetoclástica consiste en la reducción del carbono metílico del acetato, generando metano y dióxido de carbono como productos finales.



Para una buena implementación y rendimiento de un proceso de digestión anaerobia se debe tener en cuenta que las arqueas metanogénicas presentan gran cantidad de parámetros que pueden limitar o inhibir su actividad (Chen et al. 2008): la luz, el oxígeno, el amonio (principalmente en forma de amoníaco) y los parámetros que regulan la concentración de este último como la temperatura y el pH, el sulfuro, iones de metales ligeros (Na, K, Mg, Ca, Al), metales pesados y una gran variedad de compuestos orgánicos.

### 3. Material y métodos

#### 3.1 Muestreo

Los gránulos flotantes fueron obtenidos del efluente de un digestor anaerobio IC/Biopaq® (465 m<sup>3</sup> de volumen, caudal de entrada promedio de 2400 m<sup>3</sup>/día, carga contaminante promedio del influente de 8400 kg DQO/día), localizado en las instalaciones de la EDAR de Cobega Martorelles (Barcelona). La tecnología IC está basada en el proceso UASB,

ampliamente probado. Su desarrollo comenzó a finales de los 80 y el primer reactor de circulación interna (IC) se puso en operación en 1987. Utiliza el denominado separador trifásico para la retención de biomasa. En realidad el reactor IC consiste en dos reactores UASB superpuestos, uno trabajando a alta carga y otro a baja carga. El biogás recogido en la primera fase, al ascender por un conducto central, produce una circulación interna que da el nombre al reactor. Los gránulos flotantes analizados en el presente estudio se recogieron en el canal de salida de dicho reactor IC (Figura 1).



*Figura 1. Instalaciones de la EDAR de Cobega Martorelles (Barcelona) y canal de salida del reactor biológico*

#### 3.2 Análisis de la comunidad procariota

Para estudiar la composición procariota de los gránulos flotantes se seccionaron entre 15 y 20 gránulos, en los que se observó una morfología diferencial entre la parte interna y externa en todos ellos (Figura 2). Dada esta morfología diferencial, se decidió analizar por separado la composición microbiológica de las dos partes de los gránulos, separando la carcasa exterior (o parte exterior), de la

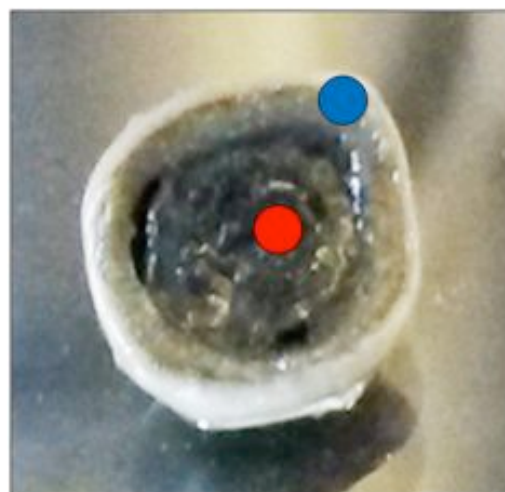
parte interior, fijándolas por separado con etanol al 96%.

La presencia de arqueas metanogénicas se monitorizó mediante el uso de un test comercial de FISH (del inglés Fluorescence In Situ Hybridization) con metodología estandarizada y soluciones preparadas (VIT® Methanogenic bacteria, vermicon AG, Germany). El test detecta procariotas metanogénicos pertenecientes al grupo Euryarchaeota, grupo que cubre el rango de arqueas descritas como responsables del proceso de metanogénesis (Liu and Whitman, 2008). La preparación de las muestras y la hibridación in situ se realizó de acuerdo al manual del test VIT® Methanogenic bacteria. El análisis de los principales grupos procariotas comúnmente implicados en la digestión anaerobia o asociados a ambientes anaeróbicos (Weinberger and Höötmann, 2011) fue realizado mediante el uso de sondas específicas de ADN con marcadores fluorescentes (Snaidr et al. 1997). Los recuentos de procariotas totales se realizaron mediante tinción DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Los recuentos de células viables totales se llevaron a cabo mediante el uso de sondas generales específicas para los dominios Eubacteria y Archaea (Amann et al. 1995). Las muestras se aplicaron en filtros en lugar de aplicarlas sobre portaobjetos de vidrio. Las células hibridadas fueron excitadas y examinadas bajo un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiostar. El

porcentaje de los diferentes grupos procariotas en relación al total de células viables se representa como la media del porcentaje de cada grupo procariota en un mínimo de 10 campos elegidos aleatoriamente. Para el recuento de células y cálculo de números absolutos se utilizó un ocular con retículas cruzadas.

#### 4. Resultados y Discusión

En el momento de la toma de muestras el reactor presentó un fango granular con un 82% de los gránulos mayoritariamente de tamaño grande (> 2'5 mm de diámetro) y más de la mitad, concretamente el 55%, presentaron un diámetro mayor a 3'15 mm. El color de los gránulos fue gris y marrón, con una estructura blanda, esponjosa y deformable, hasta el punto de que los gránulos eran capaces de pasar por rejillas de diámetro inferior al tamaño del gránulo.



*Figura 2. Gránulo flotante seccionado, en azul zona externa y en rojo zona interna*

También se observaron algunos gránulos rotos. Según Díaz et al. (2006), los gránulos de un fango granular se pueden clasificar en: i) gránulos “jóvenes o negros”, de estructura compacta, pequeño tamaño y con distribución homogénea de la comunidad de procariotas (sin formación de capas bien definidas); ii) gránulos “grises”, con capas bien definidas y mayor tamaño; y iii) gránulos “marrones o viejos”, de estructura blanda y esponjosa y tamaño relativamente grande. De éstos, únicamente los gránulos “negros” albergan en su interior microorganismos activos. Por otro lado, asocia la rotura granular principalmente a gránulos “viejos”, debido a problemas de difusión.

Los gránulos del reactor IC podrían ser caracterizados mayoritariamente como un conjunto de gránulos “grises” y “viejos” si nos basamos en el tamaño de los mismos. Por otro lado, la estructura blanda y deformable sería más bien un hecho característico de gránulos “viejos”, más dados a mostrar flotación por un mayor aislamiento y mayor inactividad microbiológica de la zona interior del gránulo y por una consecuente mayor dificultad de difusión del biogás.

El análisis molecular mediante FISH de la comunidad de microorganismos procariotas de los gránulos flotantes mostró una diversidad coincidente con la observada en otros reactores biológicos de digestión anaerobia (Ariesyday et al. 2007; Chouari et al.

2005; Liu et al. 2002; Narihiro et al. 2009; Tagawa et al. 2000). Como se observa en la Tabla 1, los gránulos flotantes analizados en el presente estudio mostraron una clara dominancia de arqueas metanogénicas, así como presencia de grupos típicamente asociados a alguna de las etapas de los procesos de digestión anaerobia, como las arqueas del grupo de los Crenarchaeota (Chouari et al. 2015) y eubacterias de los grupos Cytophaga-Flexibacter (Bacteroidetes), Proteobacterias (Alfa, Beta, Gamma y Delta), Firmicutes, Chloroflexi y el grupo minoritario de las Planctomycetales (Chouari et al. 2005; Narihiro and Sekiguchi 2007). El único punto discordante del análisis respecto a la bibliografía consultada fue la no detección en los gránulos flotantes de Actinobacterias, organismos ampliamente detectados en los sistemas de digestión anaerobia, aunque en bajas abundancias (Ariesyday et al. 2007; Rivière et al. 2009). Otros tipos bacterianos también referenciados en reactores biológicos de digestión anaerobia como los Synergistes, Thermotogales o Spirochaetes, con valores de abundancia normalmente residuales, no fueron contemplados en el presente estudio.

El análisis de los gránulos flotantes mostró diferencias microbianas entre la capa externa e interna (Tabla 1 y Figura 3). En primer lugar, la capa externa presentó una mayor abundancia de células totales ( $4,0E+09$ ) que la parte interna ( $9,6E+08$ ) del gránulo, así

como una mayor abundancia de células viables ( $1,1E+09$  y  $2,4E+08$ , respectivamente).

con tecnología de fango en suspensión.

Tabla 1

Taxones	Parte externa		Parte interna	
	Percentage %	células / mL	Percentage %	células / mL
<b>Eubacteria</b>	<b>33,45</b>	<b>3,77E+08</b>	<b>61,78</b>	<b>1,50E+08</b>
Actinobacteria	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Alphaproteobacteria	5,05	5,70E+07	0,99	2,40E+06
Betaproteobacteria	3,01	3,40E+07	0,49	1,20E+06
Chloroflexi	0,51	5,70E+06	0,01	2,40E+04
Clostridia	3,01	3,40E+07	8,22	2,00E+07
Deltaproteobacteria	13,29	1,50E+08	9,86	2,40E+07
Firmicutes (excepto Clostridia)	6,03	6,80E+07	29,18	7,10E+07
Gammaproteobacteria	0,51	5,70E+06	4,03	9,80E+06
Planctomycetes	n.d.	n.d.	2,01	4,90E+06
Cytophaga-Flexibacter	2,04	2,30E+07	6,99	1,70E+07
<b>Archaea</b>	<b>66,55</b>	<b>7,51E+08</b>	<b>38,22</b>	<b>9,30E+07</b>
Crenarchaeota	8,06	9,10E+07	6,99	1,70E+07
Metanogénicas	58,49	6,60E+08	31,23	7,60E+07
<b>Células totales</b>		<b>4,00E+09</b>		<b>9,60E+08</b>
<b>Células viables</b>		<b>1,13E+09</b>		<b>2,43E+08</b>
<b>% células viables sobre las totales</b>		<b>28,21%</b>		<b>25,35%</b>

El porcentaje de células viables también fue mayor en la parte externa del gránulo (Tabla 1) que en la interna, aunque la diferencia de viabilidad entre ambas capas fue mínima, en concreto del 3% (28% en la parte externa y 25% en la parte interna). En la parte externa de los gránulos, la abundancia de arqueas fue claramente superior a la de eubacterias, representando las arqueas el 66,5% de la población total de procariontes y las eubacterias únicamente el 33,5%. Esta diferencia de proporción de prácticamente el doble de arqueas que de eubacterias en la capa externa concuerda con valores obtenidos por Roest et al. (2005) en un sistema de digestión anaerobia

Como puede observarse en la Tabla 1, las arqueas metanogénicas representaron un porcentaje muy elevado (58%) de la abundancia total de células en la parte externa del gránulo, similar a los observados en previos estudios por varios autores (Roest et al. 2005; Tagawa et al. 2000; Liu et al. 2002; Riviére et al. 2009). Organismos pertenecientes a las Deltaproteobacterias fueron el segundo grupo en abundancia, con más del 13% de la abundancia total, seguidos por las arqueas Crenarchaeota (8%) y el grupo de eubacterias 'Firmicutes excepto Clostridia' (5%).

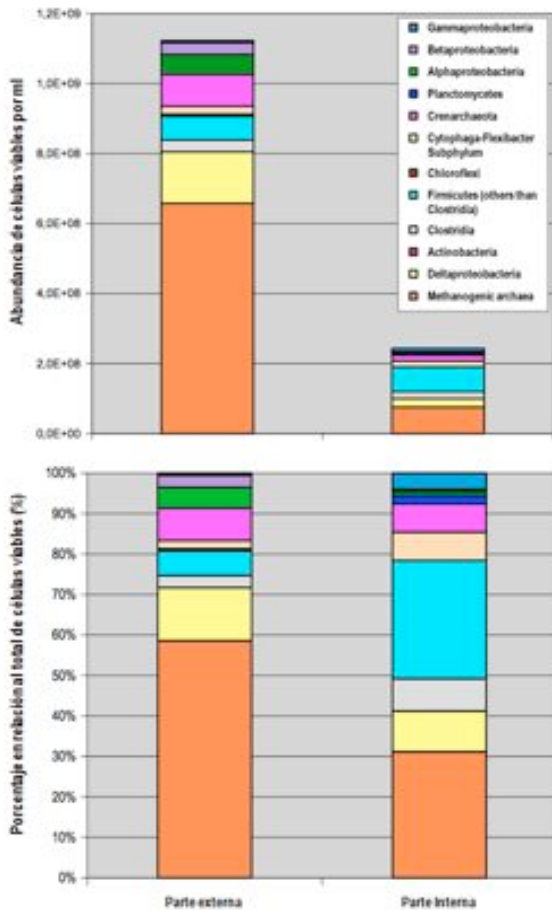


Figura 3. Abundancia y porcentaje de células

Como muestran Riviére et al. (2009) y Roest (2007), las proporciones de estos grupos de eubacterias y arqueas no metanogénicas varían notablemente en función de las condiciones de operación del sistema, del tipo de sistema y del influente que trata. Así, por ejemplo, los Firmicutes pueden presentar una variación de su proporción de entre el 7 y el 46%, las Deltaproteobacteria de entre el 7 y el 78,5% y Chloroflexi de entre el 5 y el 45%, siendo importante la comparación de los datos obtenidos en este estudio con los datos obtenidos en estudios de sistemas lo más similares posible al tratamiento anaerobio de la EDAR de Cobega Martorelles, diseñado para el tratamiento de derivados de bebidas carbonatadas.

Lamentablemente, sólo hemos encontrado un único estudio científico (Narihiro et al. 2015) centrado en el análisis de la composición procarionta en sistemas de digestión anaeróbica tratando agua residual de industrias de bebidas carbonatadas. Dicho sistema operaba con tecnología de lecho empacado y no de fango granular, y el análisis de las comunidades procariontas se realizó mediante pirosecuenciación y no mediante FISH. Dichos autores detectaron principalmente arqueas metanogénicas junto con eubacterias de los grupos Bacteroidetes (incluyendo los Cytophaga-Flexibacter), Chloroflexi, Firmicutes y Spirochaeta, diversidad muy similar a la observada en los gránulos del reactor de circulación interna estudiado en el presente manuscrito (con la excepción de los Spirochaeta, organismos no contemplados en este estudio). Lamentablemente, en el estudio de Narihiro et al. (2015) no se aportan datos de abundancia comparables, aunque se puede observar una dominancia de las arqueas metanogénicas y de las eubacterias Deltaproteobacter, que coinciden con los resultados obtenidos en el presente estudio.

La parte interna de los gránulos flotantes mostró, a diferencia de la parte externa, una clara dominancia de la comunidad de eubacterias (61,8% del total de células vivas) frente a la población de arqueas (38,2%). Aún así, las arqueas metanogénicas fueron de nuevo el grupo procarionta dominante, aunque



con un porcentaje menor al observado en la capa externa (concretamente del 31%) y una abundancia claramente inferior. Además, éstas mostraron una menor intensidad de brillo que las de la capa externa, sugiriendo una menor actividad de la población de arqueas metanogénicas en la parte interna de los gránulos que en la parte externa (Figura 4). Este hecho concuerda con lo publicado por Díaz et al. (2006) y Saiki et al. (2002) en otros sistemas anaerobios de fango granular, en los que se observó una mayor actividad de la población procariota (no únicamente de las arqueas metanogénicas) en la parte más exterior de los gránulos que en la zona central, donde la mayor parte de las células se encuentran principalmente muertas, latentes o en estado de resistencia. La excepción a este hecho se da en los gránulos jóvenes, de color negro y tamaño pequeño, donde aún no ha ocurrido la estructuración en capas bien definidas, típica de gránulos más maduros (Díaz et al. 2006).

Respecto la comunidad de eubacterias en la parte interior de los gránulos, sorprende la elevada abundancia de células del grupo de los Firmicutes (excepto Clostridia), representando el 29% del total de células viables (Tabla 1), y de hasta el 37% si añadimos también los Firmicutes del género Clostridia, siendo entonces el principal grupo en abundancia en la parte interna del gránulo. Este dato es sorprendente a la vez que interesante ya que, como se ha

comentado anteriormente, los gránulos flotantes del presente estudio se caracterizan principalmente como de tipo “viejo” y “gris”, con una zona interior con poca actividad procariota y con una función principalmente de reserva para los organismos procariotas de la parte externa (Díaz et al. 2006; Saiki et al. 2002). Los Gammaproteobacteria también han mostrado, sorprendentemente, una mayor abundancia en la zona interna del gránulo que en la externa, aunque la abundancia de este grupo es claramente inferior a la de los Firmicutes. Los grupos bacterianos Deltaproteobacteria, Clostridia, Cytophaga-Flexibacter y las arqueas Crenarchaeota también presentaron abundancias relevantes en la parte interior de los gránulos, aunque menores a las que presentaron en las capas más externas. Células pertenecientes al grupo Planctomycetes, ausentes en la capa externa, se detectaron en el interior de los gránulos flotantes.

Los Firmicutes son un grupo de eubacterias importante y abundante en prácticamente la totalidad de reactores de digestión anaerobia, siendo una parte activa importante en los procesos de hidrólisis y acidogénesis y localizados mayoritariamente en las capas más externas de los gránulos, como observó Liu et al. (2002) en relación a los Clostridiales (organismos pertenecientes a los Firmicutes). El hecho que en el presente estudio los Firmicutes hayan presentado una abundancia sorprendentemente elevada en la parte interna de los

gránulos (mayor que la observada en la capa externa) podría indicar que en el interior de los mismos se está llevando a cabo una parte importante de las etapas de hidrólisis y acidogénesis del proceso de digestión anaerobia, generando una cantidad suficiente de sustratos y compuestos para el establecimiento y realización de las restantes etapas de digestión anaerobia, que derivaría en la producción y acumulación de biogás en el interior de los gránulos. Si ese fuera el caso, la profundidad a la que se encontraría el biogás dificultaría su difusión hacia el medio circundante y, en consecuencia, favorecería la flotación del gránulo.

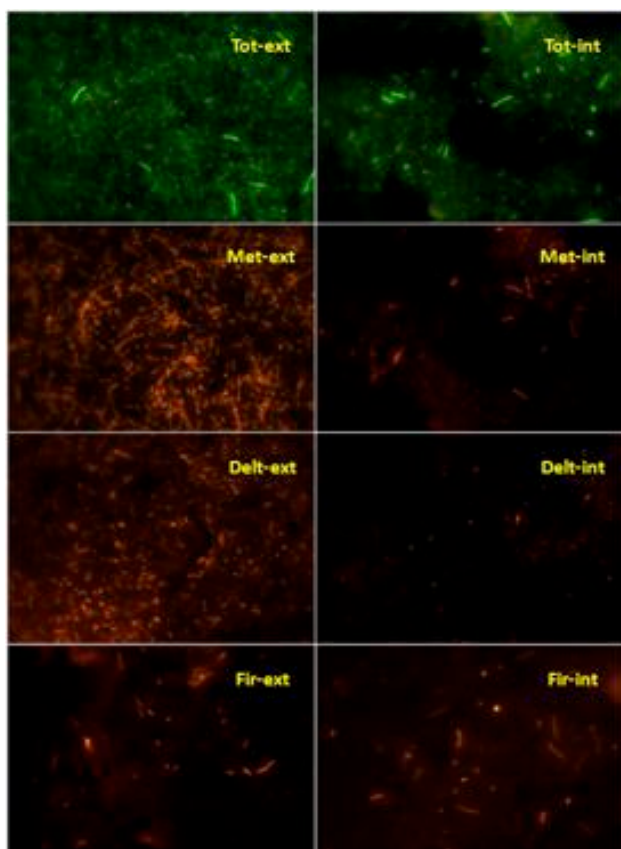


Figura 4. Imágenes mediante FISH de células

Si a esto le añadimos la posible presencia de una capa bacteriana y/o metanogénica suficientemente gruesa en la capa externa de los gránulos, la difusión del biogás acumulado en el interior del gránulo se vería fuertemente perjudicada y, por lo tanto, incrementaría todavía más la posibilidad de flotación de los gránulos, tal como observó Saiki et al. (2002) en un sistema anaerobio de fango granular de tratamiento de aguas residuales provenientes de una industria cervecera.

## 5. Conclusiones

El análisis microscópico mediante la tecnología VIT© y FISH de los gránulos flotantes del reactor de digestión anaerobia de la EDAR de Martorelles ha mostrado una composición de la comunidad procariota característica de un digestor anaerobio. La comunidad procariota de los gránulos flotantes ha estado compuesta por arqueas metanogénicas y del grupo Crenarchaeota y por eubacterias del grupo de los Firmicutes, Cytophaga-Flexibacter (Bacterioidetes), Deltaproteobacteria y Chloroflexi, entre otras.

Los gránulos flotantes han presentado claras diferencias en la composición de la comunidad microbiana entre las capas externa e interna de los mismos. La parte externa de éstos ha presentado una mayor abundancia de células y una mayor actividad, siendo las arqueas metanogénicas el grupo procariota

dominante, en concordancia con los valores de proporción reportados por numerosos estudios publicados en revistas de ámbito internacional.

La parte interna de los gránulos flotantes ha estado dominada sorprendentemente por eubacterias del grupo de los Firmicutes, por delante de las arqueas metanogénicas. Su elevada abundancia en la parte interna del gránulo podría sugerir una importante actividad hidrolítica y acidogénica en el interior granular, generando una concentración suficiente de sustratos para la realización completa del proceso de digestión anaerobia, incluyendo la etapa de metanogénesis y la producción de biogás. La acumulación de biogás en el interior de los gránulos, junto con la mayor dificultad de difusión del mismo hacia el exterior, favorecería, en último lugar, la flotación granular.

## 6. Agradecimientos

Agradecemos a MicroPlanet Laboratorios SL por impulsar este proyecto de investigación, a la empresa Vermicon AG por el soporte técnico prestado y a Amaya Celaya (Cobega Embotellador) por facilitar las muestras necesarias para realizar el estudio.

## Bibliografía

- Amann, R.I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, vol. 59 (1), págs. 143-169.
- Ariesyday, H.D.; Ito, T.; Okabe, S. (2007) Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. *Water Research*, vol. 41 (7), págs. 1554-1568.
- Batstone, D.J.; Keller, J.; Blackall, L.L. (2004) The influence of substrate kinetics on the microbial community structure in granular anaerobic biomass. *Water Research*, vol. 38 (6), págs. 1390-1404.
- Calli, B.; Mertoglu, B.; Tas, N.; Inanc, B.; Yenigun, O.; Ozturk, I. (2003) Investigation of variations in microbial diversity in anaerobic reactors treating landfill leachate. *Water Science and Technology*, vol. 48 (4), págs. 105-112.
- Calli, B.; Mertoglu, B.; Roest, K.; Inanc, B. (2006) Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate. *Bioresource Technology*, vol. 97 (4), págs. 641-647.
- Chen, Y.; Cheng, J.J.; Creamer, K.S. (2008) Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology*, vol. 99, págs. 4044-4064.
- Chouari, R.; Le Paslier, D.; Daegelen, P.; Ginestet, P.; Weissenbach, J.; Sghir, A. (2005) Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environmental Microbiology*, vol. 7 (8), págs. 1104-1115.
- Chouari, R.; Guermazi, S.; Sghir, A. (2015) Co-occurrence of Crenarchaeota, Thermoplasmata and methanogens in anaerobic sludge digesters. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 31 (5), págs. 805-812.
- Díaz, E.E.; Stams, A.J.M.; Amils, R.; Sanz, J.L. (2006) Phenotypic properties and microbial diversity of methanogenic granules from a full-scale upflow anaerobic sludge bed reactor treating brewery wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72 (7), págs. 4942-4949.
- Liu, W.T.; Chan, O.C.; Fang, H.H.P. (2002) Characterization of microbial community in granular sludge treating brewery wastewater. *Water Research*, vol. 36 (7), págs. 1767-1775.
- Liu, Y.; Whitman, W.B. (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1125, págs. 171-189.
- McMahon, K.D.; Zheng, D.; Stams, A.J.M.; Mackie, R.I.; Raskin, L. (2004) Microbial population dynamics during start-up and overload conditions of anaerobic digesters treating municipal solid waste and sewage

sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 87 (7), págs. 823-834.

Narihiro, T.; Sekiguchi, Y. (2007) Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatments: a microbiological update. *Environmental Biotechnology*, vol. 18 (3), págs. 273-278.

Narihiro, T.; Terada, T.; Kikuchi, K.; Iguchi, A.; Ikeda, M.; Yamauchi, T.; Shiraishi, K.; Kamagata, Y.; Nakamura, K.; Sekiguchi, J. (2009) Comparative analysis of bacterial and archaeal communities in methanogenic sludge granules from upflow anaerobic sludge blanket reactors treating various food-processing, high-strength organic wastewaters. *Microbes and Environments*, vol. 24 (2), págs. 88-96.

Narihiro, T.; Kim, N.K.; Mei, R.; Nobu M.K.; Liu, W.T. (2015) Microbial community analysis of anaerobic reactors treating soft drink wastewater. *Plos One*, doi: 10.1371/journal.pone.0119131.

Rivière, D.; Desvignes, V.; Pelletier, E.; Chaussonnerie, S.; Guermazi, S.; Weissenbach, J.; Li, T.; Camacho, P.; Sghir, A. (2009) Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion sludge. *The ISME Journal*, vol. 3 (6), págs. 700-714.

Roest, K.; Heilig, H.G.H.J.; Smidt, H.; de Vos, W.M.; Stams, A.J.M.; Akkermans, A.D.L. (2005) Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater. *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 28 (2), págs. 175-185.

Roest, K. (2007) Microbial community analysis in sludge of anaerobic wastewater treatment systems. Integrated culture-dependent and culture-independent approaches. Tesis doctoral. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

Saiki, Y.; Iwabuchi, C.; Katami, A.; Kitagawa, Y. (2002) Microbial analyses by fluorescence in situ hybridization of well-settled granular sludge in brewery wastewater treatment plants. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 93 (6), págs. 601-606.

Schmidt, J. and Ahring B.K. (1996). Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 49 (3), págs. 229-246.

Snaird, J.; Amann, R.; Huber, I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. (1997) Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63 (7), págs. 2884-2896.

Tagawa, T.; Syutsubo, K.; Sekiguchi, Y.; Ohashi, A.; Harada, H. (2000) Quantification of methanogen cell density in anaerobic granular sludge consortia by fluorescence in-situ hybridization. *Water Science and Technology*, vol. 42 (3-4), págs. 77-82.

Weinberger, G.; Höttmann, U. (2011) Wastewater treatment plants – a look into a black box. IPW 11-12/2011:18-21. [www.ipwonline.de](http://www.ipwonline.de).

Fig. 1. a) Reactor anaerobio de Circulación Interna de la EDAR de Cobega Martorelles. b) Detalle de los gránulos flotantes en los canales de salida de efluente del reactor IC.

Fig. 2. Imagen de un gránulo flotante cortado por la mitad. El círculo azul muestra la parte externa del gránulo, el círculo rojo marca la parte interna.

Tabla 1. Abundancia y porcentaje en relación a la abundancia total de procariotas (Eubacteria y Archaea) de los principales grupos taxonómicos (n.d.: no detectados).

Fig. 3. Abundancia (células viables por ml) y porcentaje en relación al total de células viables (%) de los diferentes grupos taxonómicos en la parte externa e interna de los gránulos flotantes.

Fig. 4. Imágenes mediante FISH de células totales viables (Tot), arqueas metanogénicas (Met), Deltaproteobacteria (Delt) y Firmicutes (Fir) en el exterior (ext) e interior (int) de los gránulos flotantes.