

Títol del treball: Caracterització de la comunitat de bacteris i arqueus oxidadors d'amoni a arrels de *Typha angustifolia* en diferents sistemes aquàtics

Estudiant: Gal·la Ramis Jorba

Grau en Biologia

Correu electrònic: ramis.jorba@gmail.com

Tutora: Elena Hernández del Amo

Empresa / institució: Institut d'Ecologia Aquàtica, Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor*):

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

Caracterització de la comunitat de bacteris i arqueus oxidadors d'amoni a arrels de *Typha angustifolia* en diferents sistemes aquàtics

Agraïments

*Per tota la paciència,
per compartir el teu temps,
per fer-me sentir com a casa,
a tu, Elena.*

Índex

Resum	i
Resumen	ii
Abstract	iii
1. Introducció	1
2. Aim	5
3. Metodologia.....	5
3.1. Obtenció de les mostres	5
3.2. Quantitat i qualitat de les extraccions d'ADN.....	6
3.3 Quantificació dels gens d'interès.....	6
3.4. Seqüenciació massiva de les mostres d'ADN.....	8
3.5. Anàlisi de la qualitat de les seqüències obtingudes.....	8
3.6. Alineament i agrupació en OTUs de les seqüències	8
3.7. Anàlisi de l'alfa-diversitat.....	9
3.8. Anàlisi de la beta-diversitat.....	9
3.9. Anàlisis estadístiques.....	10
4. Ètica i sostenibilitat.....	11
5. Resultats.....	11
5.1. Caracterització dels punts de mostreig.....	11
5.2. Quantificació dels gens d'interès.....	12
5.3. Abundàncies relatives del gen <i>amoA</i>	13
5.4. Caracterització de la comunitat microbiana.....	17
5.5. Anàlisi de la diversitat de la comunitat.....	20
5.5.1. Anàlisi de l'alfa-diversitat.....	20
5.5.2. Anàlisi de la beta-diversitat.....	21
6. Discussió.....	25
7. Conclusions.....	29
8. Bibliografia.....	30

Resum

L'amoni és un dels principals components de nitrogen que es troben en els sistemes aquàtics, i alguns microorganismes són capaços d'utilitzar-lo i, a través de la nitrificació, oxidar-lo fins a nitrat. El primer pas de la nitrificació, l'oxidació l'amoni a nitrit, es porta a terme per arqueus oxidants de l'amoni (AOA) i per bacteris oxidants de l'amoni (AOB). L'oxidació de l'amoni en l'aigua i en el sediment depèn en gran mesura de la disponibilitat d'oxigen. Les macròfites emergents, com *Typha angustifolia*, augmenten les concentracions d'oxigen a la rizosfera causa de la fuga contínua d'oxigen de les arrels, generant així un microambient aeròbic en estret contacte amb la superfície de l'arrel.

En aquest treball es va investigar l'abundància, diversitat i estructura de la comunitat d'AOA i AOB, utilitzant els gens de *amoA* i 16S rRNA com a biomarcadors moleculars, per examinar com la permeabilitat a l'oxigen afecta la distribució espacial de AOA i AOB en la superfície radicular de *Typha angustifolia*, de tres sistemes aquàtics amb diferent conductivitat de l'aigua. La seqüenciació massiva i els resultats de les qPCR van mostrar que els AOB eren els oxidadors d'amoni predominants en els tres sistemes. L'AOB principal va ser *Nitrosococcus* i el fílum principal d'AOA va ser *Thaumarchaeota*. Les abundàncies relatives del gen *amoA* en bacteris i arqueus van ser significativament diferents en els diferents sistemes aquàtics. D'igual manera, les comparacions dels diferents sistemes aquàtics amb el marcador 16S rRNA van mostrar una distribució heterogènia de la comunitat. Les diferents seccions de l'arrel (base, mig, punta, sediment) van mostrar una distribució homogènia de la comunitat microbiana però una diferència significativa de l'alfa-diversitat.

Per tant, s'ha pogut comprovar que les comunitats d'oxidadors d'amoni vinculades a les arrels de *Typha angustifolia* es veuen afectades principalment per les condicions fisicoquímiques del sistema on es troben, mentre que l'efecte de la difusió d'oxigen a les diferents parts de l'arrel afecta en menor mesura.

Resumen

El amonio es uno de los principales componentes de nitrógeno que se encuentran en los sistemas acuáticos, y algunos microorganismos son capaces de utilizarlo y, a través de la nitrificación, oxidarlo hasta a nitrato. El primer paso de la nitrificación, la oxidación del amonio a nitrito, se lleva a cabo por arqueas oxidantes del amonio (AOA) y por bacterias oxidantes del amonio (AOB). La oxidación del amonio en el agua y en el sedimento depende en gran medida de la disponibilidad de oxígeno. Las macrófitas emergentes, como *Typha angustifolia*, aumentan las concentraciones de oxígeno en la rizosfera debido a la fuga continua de oxígeno de las raíces, generando así un microambiente aeróbico en estrecho contacto con la superficie de la raíz.

En este trabajo se investigó la abundancia, diversidad y estructura de la comunidad de AOA y AOB, utilizando los genes de *amoA* y 16S rRNA como biomarcadores moleculares, para examinar como la permeabilidad al oxígeno afecta la distribución espacial de AOA y AOB en la superficie radicular de *Typha angustifolia*, de tres sistemas acuáticos con diferente conductividad del agua. La secuenciación masiva y los resultados de las qPCR mostraron que los AOB eran los oxidadores de amonio predominantes en los tres sistemas. El AOB principal fue *Nitrosococcus* y el filo principal de AOA fue *Thaumarchaeota*. Las abundancias relativas del gen *amoA* en bacterias y arqueas fueron significativamente diferentes en los tres sistemas acuáticos analizados. De igual manera, las comparaciones de los diferentes sistemas acuáticos con el marcador 16S rRNA mostraron una distribución heterogénea de la comunidad. Las diferentes secciones de la raíz (base, medio, punta, sedimento) mostraron una distribución homogénea de la comunidad microbiana pero una diferencia significativa de la alfa-diversidad.

Por lo tanto, se ha podido comprobar que las comunidades de oxidadores de amonio vinculadas a las raíces de *Typha angustifolia* se ven afectadas principalmente por las condiciones fisicoquímicas del sistema donde se encuentran, mientras que el efecto de la difusión de oxígeno a las diferentes partes de la raíz afecta en menor medida.

Abstract

The first step of nitrification, oxidation of ammonia to nitrite, is performed by both ammonia-oxidising archaea (AOA) and ammonia-oxidising bacteria (AOB). Oxidation of ammonia in water and sediments is highly dependent on the availability oxygen. Emergent macrophytes, such as *Typha angustifolia*, increase oxygen concentrations in the rhizoplane due to continuous oxygen leakage from roots, thus generating an aerobic microenvironment in close contact to the root surface

The abundance, diversity and community structure of AOA and AOB were investigated, using *amoA* and 16S rRNA genes as a molecular biomarkers, to examine how oxygen permeability affect the spatial distribution of AOA and AOB on the root surface of *Typha angustifolia*, of three aquatic systems with different water conductivity. Massive sequencing and qPCR results showed that AOBs were the predominant ammonium oxidants in all three systems. The main AOB was *Nitrosococcus* and the main phylum of AOA was *Thaumarchaeota*. The relative abundances of the *amoA* gene in bacteria and archaea were significantly different in the three aquatic systems analysed. Likewise, comparisons of different aquatic systems with the 16S rRNA biomarker showed a heterogeneous distribution of the community. The different sections of the root (base, medium, tip, sediment) showed a homogeneous distribution of the microbial community but a significant difference of alpha-diversity.

Overall, we were able to show that the communities of ammonium oxidizers linked to the roots of *Typha angustifolia* are mainly affected by the physicochemical conditions of the system, while the effect of oxygen diffusion at different parts of the root affects less.

1. Introducció

El nitrogen és un compost que es troba habitualment a les aigües continentals. Aquest pot arribar de manera natural en un medi aquàtic com a conseqüència de la deposició atmosfèrica, l'escorrentia superficial i subterrània, la dissolució de dipòsits geològics rics en nitrogen, la descomposició biològica de la matèria orgànica, i la fixació de nitrogen per certs procariotes (Camargo & Alonso., 2007). No obstant això, les activitats humanes han alterat de manera significativa el cicle global del nitrogen, augmentant la seva disponibilitat en moltes regions del planeta com a conseqüència de fonts puntuals i difuses de contaminació (Vitousek et al., 1997). Degut a aquesta contaminació apareixen un seguit de problemes mediambientals en els ecosistemes aquàtics tals com, l'acidificació de rius i llacs amb baixa o reduïda alcalinitat; l'eutrofització d'aigües i proliferació d'algues tòxiques i la toxicitat directa dels compostos nitrogenats per als animals aquàtics (Laws, 2000).

La cobertura vegetal és un factor clau que controla el reciclatge del nitrogen dels sistemes aquàtics, tant de manera directa com indirecta (Vymazal, 2007). Les plantes macròfites emergents, com *Typha sp*, *Phragmites sp* o *Juncus sp*, típiques d'aigües tranquil·les, estableixen els sediments modificant la corrent dels rius. A més, també influeixen en el cicle dels nutrients i augmenten l'acumulació d'aquests, cosa que dona suport al creixement de les pròpies macròfites i a l'augment de compostos nitrogenats, el que provoca que es dugui a terme el cicle del nitrogen (Forshay et al., 2011). El nitrogen que arriba als sistemes aquàtics generalment es troba en forma d'amoni (NH_4^+), i a l'aigua es pot donar l'oxidació fins a nitrit (NO_2^-) i nitrat (NO_3^-) (Laws, 2000). Aquests compostos de nitrogen poden ser assimilats directament per les plantes però, una part important, és transformada per processos de nitrificació i desnitrificació microbiana (Faulwetter, 2009).

La nitrificació és un procés d'oxidació, es dona en condicions aeròbiques, mentre que la desnitrificació es dona en ambients anaeròbics. Les plantes transporten l'oxigen de l'atmosfera cap a les seves arrels, creant un microambient oxidat a la rizosfera dins d'un substrat anaeròbic, la qual cosa estimula la proliferació de procariotes responsables dels processos de nitrificació (Maltais-Landry et al., 2009). Per aquest motiu, les taxes de nitrificació als sistemes aquàtics poden ser més altes a la zona de la rizosfera que, a la zona del sediment (Trias et al., 2012),

La nitrificació consta de dos processos metabòlics, en condicions aeròbiques: l'oxidació de l'amoni a nitrit (nitritació) i l'oxidació del nitrit a nitrat (nitratació) [Figura 1]. Aquest procés és dut a terme per bacteris oxidadors d'amoni (AOB – *Ammonia Oxidizing Bacteria*) i arqueus oxidadors d'amoni (AOA – *Ammonia Oxidizing Archaea*) en la primera fase i, per bacteris oxidadors de nitrit en la segona fase (NOB – *Nitrite Oxidizing Bacteria*) (Könneke et al., 2005).

Durant la primera fase, l'enzim amoni mono-oxigenasa (AMO), present en la membrana dels AOB, transforma l'amoni en hidroxilamina, que posteriorment es converteix a nitrit, a través de l'hidroxilamina òxid-reductasa (HAO) (Hooper et al., 1997). En una segona fase els NOB, gràcies a la nitrit oxidoreductasa (NXR), oxiden el nitrit fins a nitrat.

Posteriorment, es podria donar el procés de desnitrificació, un procés biològic anaeròbic, generalment dut a terme per comunitats bacterianes, les quals redueixen el nitrat a formes gasoses com òxid nítric (N_2O) i nitrogen gas (N_2) [Figura 1], a través de diverses reaccions enzimàtiques seqüencials (Horn et al., 2006).

D'altra banda, part de l'amoni que arriba al sistema aquàtic també pot ser reduït de manera anòxica pels bacteris anammox [Figura 1], capaços de transformar l'amoni i el nitrit a N_2 (Dalsgaard et al., 2005).

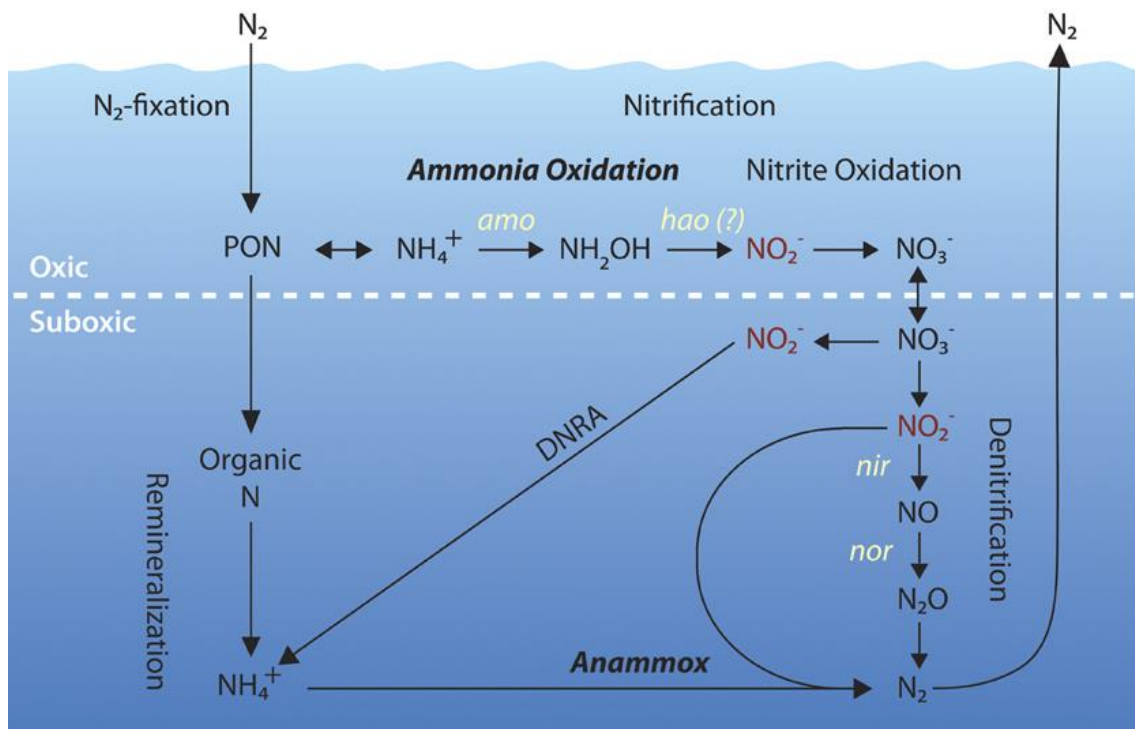


Figura 1. Transformacions microbianes del nitrogen per sobre en les interfases òxiques i anòxiques en un medi aquàtic. El nitrit està marcat en vermell per emfatitzar el seu paper com un intermediari entre les vies del nitrogen. Els gens funcionals claus exposats en el text es mostren de color blau com: amo, amoniac mono-oxigenasa; hao, hidroxilamina oxidoreductasa. (Francis et al., 2007)

La nitrificació és un procés crític per la retenció de nitrogen en els sistemes aquàtics, degut a que la composició i activitat de les comunitats microbianes nitrificants estan fortament influenciades per les condicions fisicoquímiques de l'ambient i per el tipus de vegetació present (Hartman et al. 2008; Zhang et al. 2012; Bañeras et al. 2012; Humbert et al. 2012; Trias et al. 2012). El primer pas limitant de la nitrificació és l'oxidació de l'amoni, aquest procés es troba sota la influència de diferents factors tals com, la temperatura, el pH, l'oxigen, la conductivitat i la concentració de nutrients (González et al., 2010; Trias et al., 2012).

Els AOB i els AOA són organismes quimiolitotròfics, els quals obtenen la seva energia amb l'oxidació de l'amoni i assimilen el carboni a través del cicle de Calvin. Per tant, l'oxigen és un element limitant per dur a terme el primer pas de la nitrificació (Ward et al., 2011). Les arrels adventícies de les plantes macròfites emergents mostren una difusió d'oxigen més alta a la part apical de l'arrel, en comparació amb les parts basals (Armstrong et al., 2000), això pot afectar a la distribució i diversitat de les comunitats microbianes d'AOA i AOB al llarg de les arrels, així com en el sediment que les envolta. (Trias.R et el, 2012; Llíros.M et al., 2014).

Un altre factor important que pot controlar la nitrificació i les comunitats oxidants d'amoni és la conductivitat. S'ha observat que una alta conductivitat disminueix la nitrificació (Moeller, 2001) i, a més, disminueix la ràtio entre AOA:AOB (Santoro et al., 2008).

Per tal de caracteritzar les comunitats de bacteris i arqueus i analitzar la seva diversitat s'utilitza el marcador 16S rRNA. Aquest marcador ens permet classificar filogenèticament als membres que formen les comunitats, ja que és un gen conservat al llarg de l'evolució dels procariotes (Madsen, 2000). A més a més, per estudiar en concret les comunitats de bacteris i arqueus oxidadors d'amoni s'utilitza el marcador *amoA*, el qual codifica per l'enzim amoni mono-oxigenasa (Abell et al., 2011). L'enzim AMO es compon de tres subunitats [Figura 2]: *amoA*, de 27- a 30- kDa, proteïna unida a la membrana que conté el lloc actiu d'amo; *amoB*, de 38- a 43- kDa, i *amoC* (Hooper et al., 1997). A partir del gen *amoA* podem obtenir la quantitat de bacteris i arqueus oxidants d'amoni, ja que, a diferència del 16S rRNA, el gen *amoA* només el trobarem en aquests grup de procariotes.

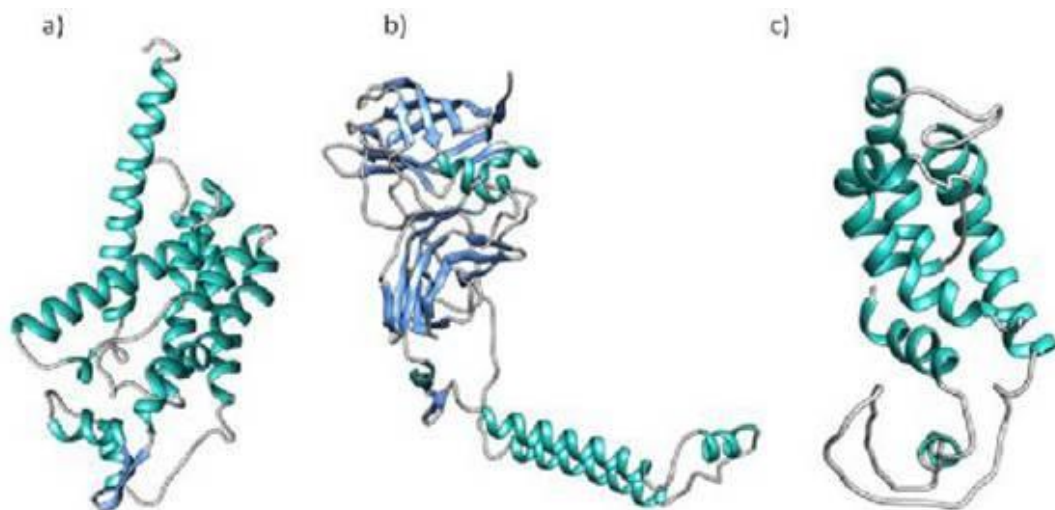


Figura 2. Modelatge molecular de les subunitats de l'enzim amoni monooxigenasa (AMO) bacteriana construïdes pel servidor Swiss-Model (Kiefer et al., 2009). a) Subunitat A de *Nitrosococcus oceanus* (ATCC 19707 (Genbank: AAB57809.1); b) Subunitat B de *Nitrosococcus oceanus* (ATCC 19707) (Genbank: AAC25092.1 i c) Subunitat C de *Nitrosomonas eutropha* (C91) (Genbank: ABI59765.1). Imatge de Andredae-Ochoa et al., 2015.

Tots els AOB d'aigües continentals coneguts fins al moment pertanyen al grup de β -proteobacteris, incloent *Nitrosomonas* i *Nitrosospira* i al grup de γ -proteobacteris on trobem el gènere de *Nitrosococcus*. Ambdós grups de proteobacteris presenten les 3 subunitats de AMO (Zhou et al., 2016; Andredae-Ochoa et al., 2015).

D'altra banda, el recent descobriment dels gens homòlegs de l'amoni monooxigenasa en arqueus (Andredae-Ochoa et al., 2015) i el cultiu d'AOA autòtrofs revelen un grup addicional de microorganismes capaços de catalitzar el procés de nitrificació. Els estudis realitzats fins ara mostren que aquest grup d'arqueus, pertanyen als regnes dels *Crenarchaeota* i *Thaumarchaeota* (Zhou et al., 2016). L'àmplia distribució en estudis ambientals dels gens relacionats amb la monooxigenasa d'amoni d'arqueus (gens *amo*) i el seu domini numèric sobre els seus homòlegs bacterians en ambients marins i terrestres suggereixen que, els AOA juguen un paper important en la nitrificació (Andredae-Ochoa et al., 2015)

2. Aim

In this work, we have studied communities of AOA and AOB in *Typha angustifolia* roots in different aquatic systems of Baix Ter (Catalunya). The main aim was to characterize the AOB and AOA community along the root, taking into account that oxygen diffusion was different in each part of the root and analyse at the same time if the physico-chemical parameters of the aquatic system could influence these communities. To achieve this aim, two derived objectives were proposed:

- Evaluate the relative abundances of the functional gene *amoA*, responsible of the ammonia oxidation in bacteria and archaea.
- Evaluate the diversity, richness, structure and taxonomy of the microbial community through the phylogenetic marker 16S rRNA.

3. Metodologia

3.1. Obtenció de les mostres

Les mostres d'arrels de *Typha angustifolia* que s'han utilitzat per a dur a terme aquest estudi provenen del Baix Ter (Girona) de tres sistemes aquàtics diferents: bassa de les tortugues (BT), unió del Rec des Coll amb el riu Daró (RD) i desembocadura del Daró (DD) [Figura 3].



Figura 3. Geolocalització de les zones mostrejades del Baix Ter . Bassa de les tortugues (42.01235, 3.18427), Unió del Rec Coll-riu Daró (42.00732, 3.18685) i Desembocadura del Daró (42.00585, 3.19501)

Es van analitzar les característiques fisicoquímiques de cada punt de mostreig: temperatura, pH, oxigen i conductivitat.

Les arrels mostrejades tenien una longitud entre 6 i 8 cm. Les diferents parts de l'arrel mostrejades van ser: base (B, a partir de 4,5 cm des de la part apical de l'arrel), mig (M, entre 3 i 4,5 cm des de la part apical de l'arrel) i punta (T, primers 1,5 cm de la part apical de l'arrel) i part del sediment que envoltava l'arrel (S). Els fragments d'arrel que es van mostrejar, eren de 1 cm. L'extracció d'ADN de la qual es va partir per a fer aquest estudi es va realitzar a partir del mètode de CTAB (Lirós, Casamayor, & Borrego, 2008) amb digestió prèvia amb lizosim i proteïnasa K.

3.2. Quantitat i qualitat de les extraccions d'ADN

Per mesurar la puresa d'ADN de les mostres es van analitzar a través d'un espectofotòmetre NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies Inc. Wilmington, EE.UU) a una absorbància de 230nm, 260nm i 280nm.

Les concentracions d'ADN de cada mostra es van determinar utilitzant el fluoròmetre Qubit (Invitrogen, Lidingö, Suecia), mesclant 198µl de MIX, tal com indica el fabricant, i 2µl de mostra en els tubs, i centrifugant-los a 5000rpm durant 30 segons abans de mesurar-ho. El kit utilitzat per a fer les mesures amb el Qubit va ser el *High Sensitive* (HS).

3.3. Quantificació dels gens d'interès

Per tal de quantificar els gens estructurals i funcionals d'interès es va utilitzar la PCR quantitativa (qPCR). Es va realitzar una qPCR per 4 gens diana 16S rRNA Bacteria, 16S rRNA Archaea, *amoA* Bacteria i *amoA* Archaea. Les qPCR es van realitzar en reaccions finals de 20µl utilitzant plaques de qPCR de 96 pouets i film de segellar (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EE.UU). Aquests volums contenia tots els reactius necessaris per la qPCR en les concentracions que es detallen [Taula 1] i 2µl de DNA motlle.

Taula 1. Reactius utilitzats per a cada reacció de qPCR per tal d'obtenir un volum total de 18µl.

Reactiu	Concentració per reacció
LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche)	1X
Primer Forward	1µM
Primer Reverse	1µM

Per cada qPCR es van incloure dos controls negatius sense mostra per verificar que no hi hagués contaminació. Les reaccions es van realitzar a l'aparell PCR a temps real de Roche Lightcycler 96 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EE.UU). Les

dades es van recollir i analitzar amb el programa software LightCycler 96 versió 1.1. Es van utilitzar 4 parells de primers diferents en funció del gen diana desitjat en cada cas. Es resumeixen els diferents primers utilitzats per la realització de qPCRs i el programa específic utilitzat en cada cas [Taula 2].

Taula 2. Conjunt de primers utilitzats en les qPCRs. Es mostra per a cada gen, els primers que necessita per la seva amplificació, la seva seqüència, la mida del fragment esperat i el programa necessari per l'amplificació

Gen	Primers	Seqüència 5'→3'	Amplificació	Programa	
16sRNA Bacteria*	341F	CCT ACG GGA GGC AGC AG	194pb	Preincubació	95°C→10'
	534R	ATT ACC GCG GCT GCT GGC A		Desnaturalització Anellament Extensió	95°C→10" 60°C→10" 72°C→10"
16sRNA Archaea*	Arch364aF	CGG GGY GCA SCA GGC GCG AA	570pb	Preincubació	95°C→10'
	ArchA934b	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT		Desnaturalització Anellament Extensió	95°C→15" 66°C→40" 72°C→1'
amoA Bacteria*	amoA1F	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	491pb	Preincubació	95°C→10'
	amoA2R	CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC		Desnaturalització Anellament Extensió	95°C→30" 60°C→45" 72°C→30"
amoA Archaea*	crenamoA 23F	ATG GTC TGG CTW AGA CG	628pb	Preincubació	95°C→10'
	crenamoA 616R	GCC ATC CAT CTG TATGTCCA		Desnaturalització Anellament Extensió	95°C→30" 55°C→45" 72°C→30"

*La referencia d'origen de cada primer és la següent: Gen 16s RNA Bacteria (López-Gutiérrez et al., 2004), gen 16s RNA Archaea (Kemnitz, Kolb, & Conrad, 2007), amoA Bacteria (Rotthauwe, Witzel, & Liesack, 1997) i amoA Archaea (Tourna, Freitag, Nicol, & Prosser, 2008)

Al final de cada programa, es va fer un cicle corresponent a la corba de dissociació que consisteix en 95°C 15" i de 60-90°C 15".

Com a resultat de les qPCRs, s'obtenen corbes d'amplificació que serveixen per quantificar les molècules de ADN diana inicials amb una elevada precisió per un rang de concentracions més o menys ampli. En tots els casos es va utilitzar un plasmidi amb nombre de còpies conegut (des de 10⁸ fins a 10²) per tal d'obtenir una recta patró.

Per comprovar la correcta amplificació dels gens respectius a les qPCR es va realitzar una electroforesi en gel d'agarosa a 1,5% preparats en tampó TAE 1X. Es dipositaven 4µl de mostra amb tampó de càrrega (Fermentas) a cadascuna de les butxaques del gel, i es va deixar córrer 30 minuts a 85mV. El marcador utilitzat per poder comprovar la mida dels fragments a les amplificacions qPCR va ser el marcador GeneRuler 100pb. Després els gels s'incubaven en una solució amb bromur d'etidi (10mg/ml) durant 20 minuts i en agitació. Els àcids nucleics es van visualitzar en un transil·luminador Herolab UVT-20M. El programa CapturePro 07/02 va capturar i digitalitzar les imatges dels gels.

3.4. Seqüenciació massiva de les mostres d'ADN

Les mostres d'ADN es van seqüenciar a MSU Genomics Core (Michigan, USA), mitjançant la plataforma Illumina MiSeq. La regió amplificada de les mostres va ser la V3 del 16S rRNA amb els primers 515F/816R (Caporaso et al., 2010)

3.5. Anàlisi de la qualitat de les seqüències obtingudes

Per l'anàlisi de les seqüències dels gens 16S RNA, de bacteris i arqueus, es va utilitzar el programa bioinformàtic MOTHUR v1.37.4 (Schloss et al. 2011). Com a primer pas, per tal de reduir la taxa d'errors de les seqüències, generats durant la seqüenciació, es van eliminar totes aquelles seqüències que tinguessin almenys una base ambigua (N), homopolímers superiors a 8 nucleòtids (Schloss et al., 2011). A causa de que la taxa d'evolució del gen 16S rRNA no és uniforme al llarg de tota la seva longitud, les seqüències es van tallar de manera que totes tinguessin la mateixa longitud: totes les seqüències començaven al mateix lloc, mentre que el final de les seqüències es va establir a la posició on acabaven el 85% de les seqüències alineades (Schloss, 2010; Schloss i Westcott, 2011).

3.6. Alineament i agrupació en OTUs de les seqüències

Les seqüències úniques que van passar el filtre de qualitat van ser alineades a partir de la base de dades SILVA Release123 d'acord amb la proposta d'assignació filogenètica (Brochier-Armanet et al. 2008; Teske i Sørensen, 2008). Una vegada alineades, i com a mètode de control addicional per disminuir la taxa d'errors, les seqüències van ser pre-agrupades de la següent manera: les seqüències úniques alineades es van ordenar d'acord a la seva freqüència, i la seqüència més abundant va constituir el primer grup. Les seqüències subsegüents en ordre d'abundància van ser comparades amb la llista creixent de grups, i si les mateixes presentaven fins a dos diferències amb la seqüència dominant (99% identitat) eren incorporades al mateix grup, en cas contrari, constituïen un grup independent (Schloss et al., 2011).

En aquesta instància es va realitzar novament un pas de control de qualitat de seqüències, que involucrar l'eliminació de quimeres putatives utilitzant l'algoritme UCHIME implementat al MOTHUR. El conjunt de dades lliures de quimeres contenia un total de 352195 seqüències. A partir d'aquest conjunt de seqüències es va construir una taula de OTUs amb el programa USEARCH (Edgar, 2010), que consisteix en una matriu amb els noms dels OTUs (i la seva assignació taxonòmica) a les files i els noms de les mostres en les columnes. Aquesta taula conté informació sobre l'abundància absoluta cada OTU en cada mostra.

L'abundància relativa de les seqüències dels OTUs es va normalitzar a través del mètode *subsampling* descrit a MOTHUR (Schloss et al., 2011).

3.7. Anàlisi de l'alfa-diversitat

Utilitzant el programa bioinformàtic MOTHUR v1.37.4 (Schloss et al., 2011), es van calcular els següents índex de diversitat, per tal de conèixer l'alfa diversitat a les diferents mostres estudiades (Hill et al, 2003) .

- a) OTUs observats (Sobs): és la quantitat de OTUs que s'observen quan s'agrupen les seqüències d'acord a un determinat percentatge de similitud, en aquest cas 97%.
- b) Índex Chao 1, calcula la riquesa d'espècies esperada a partir del nombre d'OTUs esperats:

$$S_{chaol} = S_{obs} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)}$$

Sobs = nombre de OTUs observats

n1 = nombre de OTUs amb una única seqüència

n2 = nombre de OTUs amb només dues seqüències

- c) Índex de Shannon-Wiener: calcula la diversitat d'espècies a partir de la riquesa i el nombre total d'individus. Mesura l'abundància proporcional de cada OTU respecte la seva proporció en la mostra total.

$$H' = - \sum p_i \cdot \ln p_i$$

pi= (ni/N) abundància proporcional de clons per cada OTU

3.8. Anàlisi de la beta-diversitat

Per a l'anàlisi comparativa de la composició entre mostres es va aplicar la mesura de dissimilitud UniFrac, la qual estableix distàncies entre comunitats basades en els llinatges que representen i permet comparar moltes mostres i / o llocs simultàniament, utilitzant tècniques d'agrupament i ordenament; aquest mètode estableix les diferències entre mostres, d'acord amb la presència-absència d'OTUs (mètode unweighted) i sobre la base de l'abundància relativa dels OTUs (mètode Weighted) (Lozupone et al., 2011).

Es va escollir el mètode UniFrac Weighted el qual mesura la distància filogenètica entre parells d'OTUs i pondera les branques en funció de les dades d'abundància, de manera que no considera únicament la riquesa sinó també l'abundància relativa dels OTUs.

Les matrius de diversitat beta, basades en UniFrac, es van utilitzar per l'anàlisi de Coordenades Principals (PCoA) al mateix programa bioinformàtic MOTHUR (Schloss, 2010). PCoA és una tècnica estadística multivariant de síntesi de la informació o reducció de la dimensió (nombre de variables), que permet trobar els factors subjacents més explicatius després d'un conjunt de dades, que millor expliquin la variabilitat d'aquestes dades. L'elecció dels factors es realitza de tal manera que el primer reculli la major proporció possible de la variabilitat original; el segon factor ha de recollir la màxima variabilitat possible no recollida pel primer, i així successivament. Del total de factors s'escolliran aquells que recullin el percentatge de variabilitat que es consideri suficient. A aquests se'ls denominarà components principals. Aquesta anàlisi s'ha realitzat mitjançant el programari UniFrac, que en aquest cas pren com a dada de partida la matriu de distàncies per parelles generades amb l'algoritme Weighted UniFrac (Lozupone et al., 2011).

3.9. Anàlisis estadístiques

Per analitzar estadísticament l' α -diversitat es va comprovar la normalitzat i l'homocedesticitat de les dades amb un test de Shapiro-Will i un test de Levene, amb el programa estadístic Rcmdr 2.1-3 (Fox et al, 2007). Després es va realitzar el test no-paramètric de Kruskal-Wallis, el qual permet decidir si pot acceptar-se la hipòtesi que mostres independents procedeixen de la mateixa població o de poblacions idèntiques amb la mateixa mitjana (Vargha et al., 1998).

Per determinar les diferències de la β -diversitat de les comunitats microbianes entre els diferents punts de mostreig es va realitzar el test no-paramètric de di-similitud ANOSIM, assumint que la dispersió era homogènia entre els grups mostrejats. El test ANOSIM empra distàncies de la mitjana multivariada de cada mostra del grup al qual pertany. Si la distància mitjana entre grups és més gran que la distància mitjana de cada individu (dispersió) la diferència entre grups és significativa (Schloss et al., 2011).

4. Ètica i sostenibilitat

Durant tota l'experimentació d'aquest treball s'ha pres consciència d'estar treballant amb microorganismes extrets d'un ecosistema natural, per tant s'han adoptat en tot moment les mesures adequades per minimitzar les possibilitats de generar efectes adversos sobre l'ambient i/o la salut humana. Tenint en compte que les mostres de microorganismes amb els que em treballat no són patogènics les mesures requerides han estat simples però eficaces per disminuir els possibles danys. Aquestes mesures consisteixen bàsicament en bones pràctiques de laboratori, una gestió correcte dels residus que hagin estat en contacte amb aquests microorganismes, el manteniment de les condicions estèrils de l'aparellatge i lloc de treball així com del material reutilitzable que s'hagi usat. A més, en tots els casos s'ha tingut en compte no malbaratar el material plàstic fent un bon ús dels recursos dels que es disposava.

5. Resultats

5.1. Caracterització dels punts de mostreig

Durant el mostreig es van mesurar el paràmetres de conductivitat, oxigen, pH i temperatura de l'aigua dels diferents punts. S'observa que la bassa de les tortugues és el punt mostreig que presenta una major conductivitat amb uns valors entre 11800-12100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ i una menor temperatura de 22,77-22,82°C. El punt de mostreig de la unió del rec des Coll amb el riu Daró, és el que va presentar una menor conductivitat amb valors de 767-878 $\mu\text{S}/\text{cm}$ i una temperatura de 27,74-28,19°C. La desembocadura del Daró es trobava amb valors intermitjos de conductivitat entre els altres punts de mostreig [Taula 3].

Taula 3. Característiques fisicoquímiques (conductivitat, oxigen, pH i temperatura) dels sistemes aquàtics Rec Daró, desembocadura Daró i bassa de les tortugues del Baix Ter.

Punt mostreig	Conductivitat ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Oxigen (ppm)	pH	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Rec des Coll- Daró	878,6	12,62	7,50	28,19
Rec des Coll- Daró	767,7	12,12	7,55	27,74
Desembocadura Daró	1132,4	13,37	7,32	28,93
Desembocadura Daró	1126,1	12,73	7,31	28,46
Bassa de les tortugues	12098,1	9,49	7,18	22,82
Bassa de les tortugues	11815	9,5	7,19	22,77

5.2. Quantificació dels gens d'interès

Per poder determinar les abundàncies relatives dels gen funcional *amoA* en bacteris i arqueus es van realitzar les qPCR del gen *amoA* i del gen 16S RNA, a partir d'una patró coneguda.

Els requeriments que ha de complir una recta patró per poder ser utilitzada per dur a terme les quantificacions són: (i) Entre cada dilució decimal s'ha d'apreciar una diferència de 3,32 unitats del valor de Ct (ii) l'eficiència de la recta ha d'estar entre el 80 i el 120% [Taula 4].

Taula 4. Valors de les diferents rectes patrons obtinguts a les qPCRs. A la última columna es mostra l'eficiència de cada reacció en percentatge, el càlcul d'aquesta és: $E = [(10^{-1pendent}) - 1] \cdot 100$

Gen	Pendent	Intercepció	R ²	Eficiència
16S rRNA Bacteria	-3,57	38,06	1	91
<i>amoA</i> Bacteria	-3,17	40,8	0,98	107
16S rRNA Archaea	-3,85	40,09	1	82
<i>amoA</i> Archaea	-3,62	33,89	1	89

Les quantificacions obtingudes a partir de les qPCRs es van calcular i expressar en nombre de còpies del gen/gram d'arrel o sediment. El nombre de còpies de 16S rRNA *Bacteria* es trobava entre $1,71 \cdot 10^5$ i $6,31 \cdot 10^8$ còpies/gram d'arrel o sediment, mentre que per 16S rRNA Archaea es va trobar entre $3,57 \cdot 10^2$ i $1,49 \cdot 10^7$ còpies/gram d'arrel o sediment. Pel que fa a l'abundància del gen *amoA*, es van detectar entre $4,89 \cdot 10^4$ i $1,88 \cdot 10^6$ còpies/gram per *Bacteria* i entre $2,25 \cdot 10^1$ i $1,74 \cdot 10^5$ còpies/gram per *Archaea* [Taula 5].

Taula 5. Quantificacions dels gens *amoA* i 16S rRNA de bacteris i arqueus, amb les desviacions estàndard.

Les quantificacions estan expressades en còpies/grams d'arrel o sediment. BT (Bassa tortugues), DD (Desembocadura del Daró), RD (unió rec Coll amb el Daró). Parts de l'arrel són B (Base), M(Mig), T(Punta) i S(Sediment).

		<i>amoA</i> Bacteria	Desvest ±	16S rRNA Bacteria	Desvest ±	<i>amoA</i> Archaea	Desvest ±	16S rRNA Archaea	Desvest ±
BT	B	2,56E+05	1,10E+05	1,40E+06	1,08E+06	4,29E+02	2,47E+02	8,12E+03	9,38E+03
	M	3,06E+05	1,37E+05	1,69E+07	1,18E+07	2,51E+03	9,23E+02	9,69E+04	9,78E+04
	T	5,36E+05	0,00E+00	3,54E+08	7,39E+07	1,10E+04	6,19E+03	7,12E+05	3,18E+04
	S	1,12E+05	7,34E+04	8,02E+06	5,15E+06	5,39E+02	2,60E+02	8,60E+04	9,72E+04
DD	B	2,24E+05	6,70E+04	8,26E+07	4,30E+05	5,38E+03	3,18E+03	6,15E+05	4,30E+05
	M	4,21E+05	3,33E+05	1,55E+06	1,45E+08	3,01E+04	2,67E+04	1,55E+06	9,08E+05
	T	3,74E+05	2,87E+05	1,19E+08	8,27E+07	1,07E+04	3,49E+03	4,60E+05	1,37E+05
	S	9,10E+05	7,67E+05	3,16E+08	2,50E+08	8,33E+04	7,14E+04	5,99E+06	6,03E+06
RD	B	3,04E+05	1,22E+04	6,55E+06	2,37E+05	4,77E+02	5,28E+02	1,96E+04	1,40E+04
	M	1,64E+05	3,08E+04	1,30E+08	5,06E+07	6,56E+03	2,75E+03	1,00E+06	5,40E+05
	T	2,80E+05	2,74E+05	1,47E+07	1,30E+07	7,96E+02	5,99E+02	7,86E+04	4,44E+04
	S	2,08E+05	1,04E+05	3,54E+07	4,07E+07	1,42E+03	1,23E+03	5,85E+05	7,47E+05

5.3. Abundàncies relatives del gen *amoA*

Després es va realitzar una ràtio del gen *amoA* respecte el 16S rRNA per bacteris i arqueus en els tres punts de mostreig [Figura 4;Figura 5]. D'aquesta manera es va poder observar la importància relativa de AOB i AOA que hi ha a cada part de l'arrel de *Typha angustifolia* i al sediment que l'envolta [Figura 6] en els diferents sistemes aquàtics.

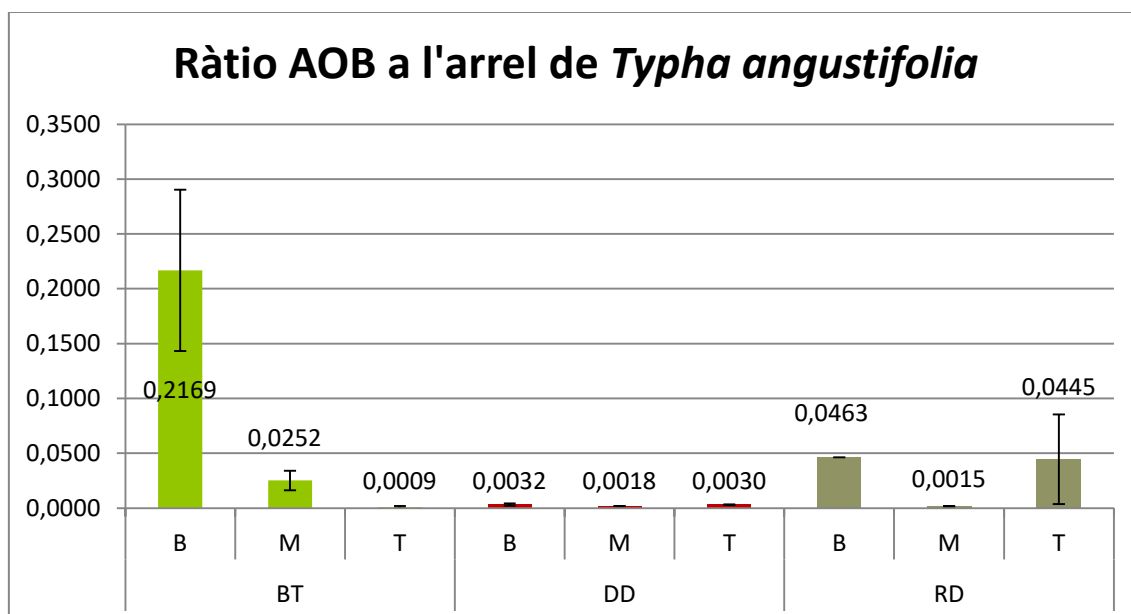


Figura 4. Ràtios del gen *amoA* respecte el 16S RNA en bacteris, dels tres punts de mostreig. BT (Bassa de les tortugues), DD (Desembocadura del riu Daró), RD (unió del Rec amb el riu Daró), en les diferents parts de l'arrel de *Typha angustifolia* B (base), M (mig) i T (punta).

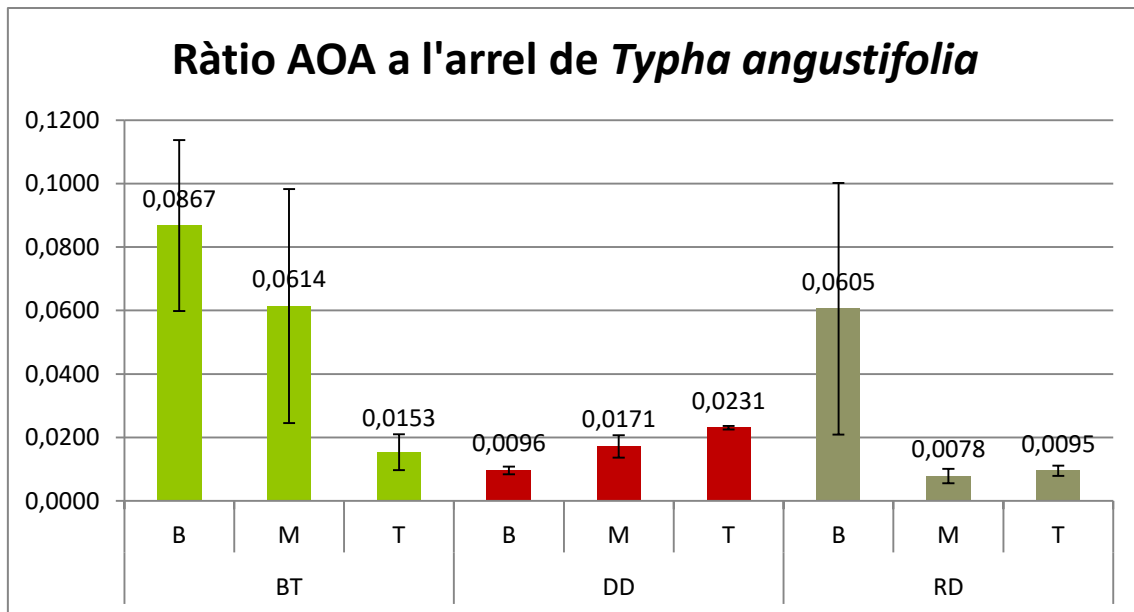


Figura 5. Ràtios del gen *amoA* respecte el 16S RNA en arqueus, dels tres punts de mostreig. BT (Bassa de les tortugues), DD (Desembocadura del riu Daró), RD (unió del Rec amb el riu Daró), en les diferents parts de l'arrel de *Typha angustifolia* B (base), M (mig) i T (punta).

Podem observar [Figura4; Figura5] que la bassa de les tortugues és la que presenta més quantitat de AOB i AOA amb unes ràtios de 0,2169 a la base, 0,0252 al mig i 0,009 a la punta de l'arrel pels AOB; i 0,0867 a la base, 0,0614 al mig i 0,0153 pels AOA. D'altra banda, la desembocadura del riu Daró és el sistema aquàtic amb menys presència d'AOB i AOA, respecte les altres dues, amb unes ràtios de 0,0032 a la base, 0,0018 al mig i 0,003 a la punta de l'arrel pels AOB i unes ràtios de 0,0096 a la base, 0,0171 al mig i 0,0231 a la punta pels AOA. També observem que en els 3 sistemes aquàtics on hi ha més presència de AOB i AOA és a la base de l'arrel, a excepció de la desembocadura del riu Daró que presenta una ràtio més alta de 0,0231 d'AOA a la punta de l'arrel. En els 3 punts de mostreig trobem més presència d'AOA respecte els AOB amb unes ràtios de 0,0867, 0,0614, 0,0155 a la bassa de les tortugues; de 0,0096, 0,0171, 0,0231 a la desembocadura del Daró; i de 0,0605, 0,0078 i 0,0095 a la unió del rec des Coll amb el Daró.

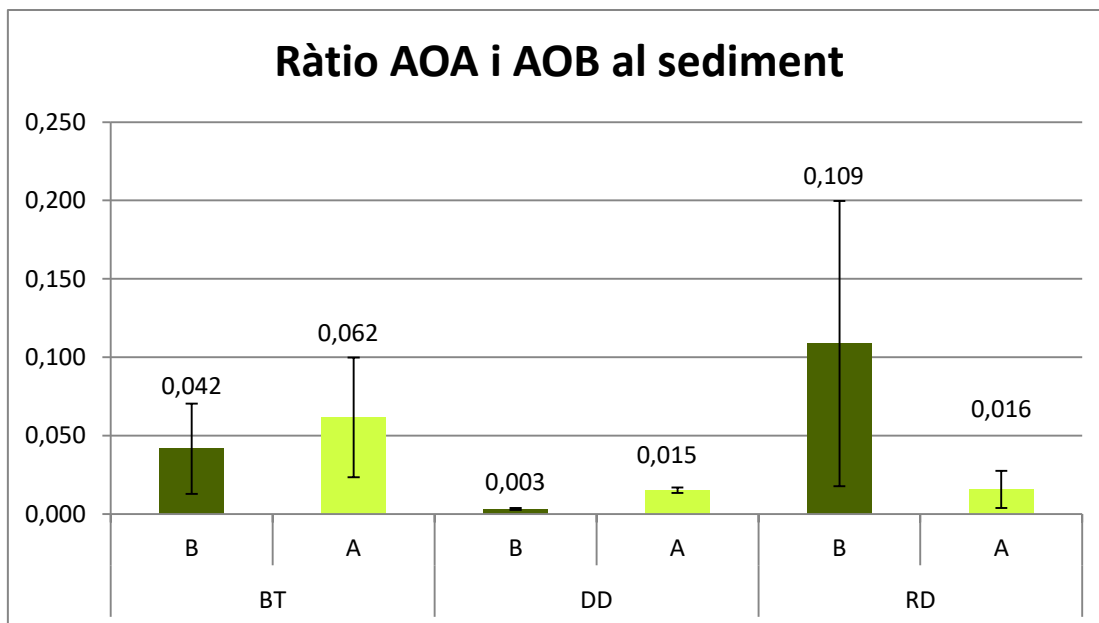


Figura 6. Ràtios del gen *amoA* respecte el 16S rRNA en bacteris (B) i arqueus (A) en el sediment que envolta l'arrel, dels tres punts de mostreig. BT (Bassa de les tortugues), DD (Desembocadura del riu Daró), RD (unió del Rec amb el riu Daró)

Respecte al sediment que envolta l'arrel de *Typha angustifolia* [Figura 6] en els sistemes aquàtics de la bassa de les tortugues i la desembocadura del Daró és on trobem més presència d'AOA amb unes ràtios de 0,062 i 0,015, respectivament. En canvi, al punt de mostreig de la unió del rec amb el riu Daró és on hi ha més presència de AOB amb una ràtio de 0,109.

Per determinar si els resultats de les ràtios eren significativament diferents, es va procedir a fer un test de Shapiro-Will i un test de Levene per determinar si les dades complien amb els paràmetres de normalitat i homocedesticitat. Com que, no es van complir els paràmetres es va realitzar un test no-paràmetric de Kruskal-Wallis. Els resultats de l'estadístic van mostrar que les ràtios del gen *amoA Bacteria*/16S rRNA i *amoA Archaea*/16S rRNA eren significativament diferents a l'hora de comparar les els tres punts de mostreig (BT, DD, RD); chi-quadrat=9,5714 i p-valor=0,0084 per *amoA Bacteria*/16S rRNA; chi-quadrat=6,3533 i p-valor=0,0417 per *amoA Archaea*/16S rRNA. Contràriament, quan vam comparar les diferents parts de l'arrel mostrejades els valors obtinguts amb Kruskal-Wallis (chi-quadrat=5,1818 p-valor=0,1587 per la ràtio *amoA Bacteria*/16S rRNA i chi-quadrat=1,1665 p-valor=0,7611 per *amoA Archaea*/16S rRNA) determinen que no són significativament diferents.

Amb les quantificacions de la qPCR del gen *amoA* també es va realitzar una ràtio de *amoA-archaea/amoA-bacteria* [Figura. 7]. Podem observar que, la ràtio més alta en aquest cas és a la desembocadura del riu Daró i la ràtio més baixa a la unió del rec

des Coll amb el Daró. Observar també, que la Desembocadura del Daró és la que va presentar unes ràtios més altes però, és també alhora la que tenia menys quantitat de còpies del gen *amoA*. En general, les ràtios més baixes s'obtingueren a la part de la base de l'arrel i les més altes a la part mitja i punta. L'estadístic Kruskal-Wallis mostrà que quan vem analitzar la ràtio *amoA*-archaea/*amoA*-bacteria segons el sistema aquàtic (BT, DD, RD) era significativament diferent amb una chi-quadrat=12,1288 i un p-valor=0,0023 .Però, quan vam analitzar la mateixa ràtio segons les diferents parts de l'arrel mostrejada obtenim una chi-quadrat=5,7674 i un p-valor=0,1235 i per tant, es van considerar mostres independents que formen la mateixa comunitat.

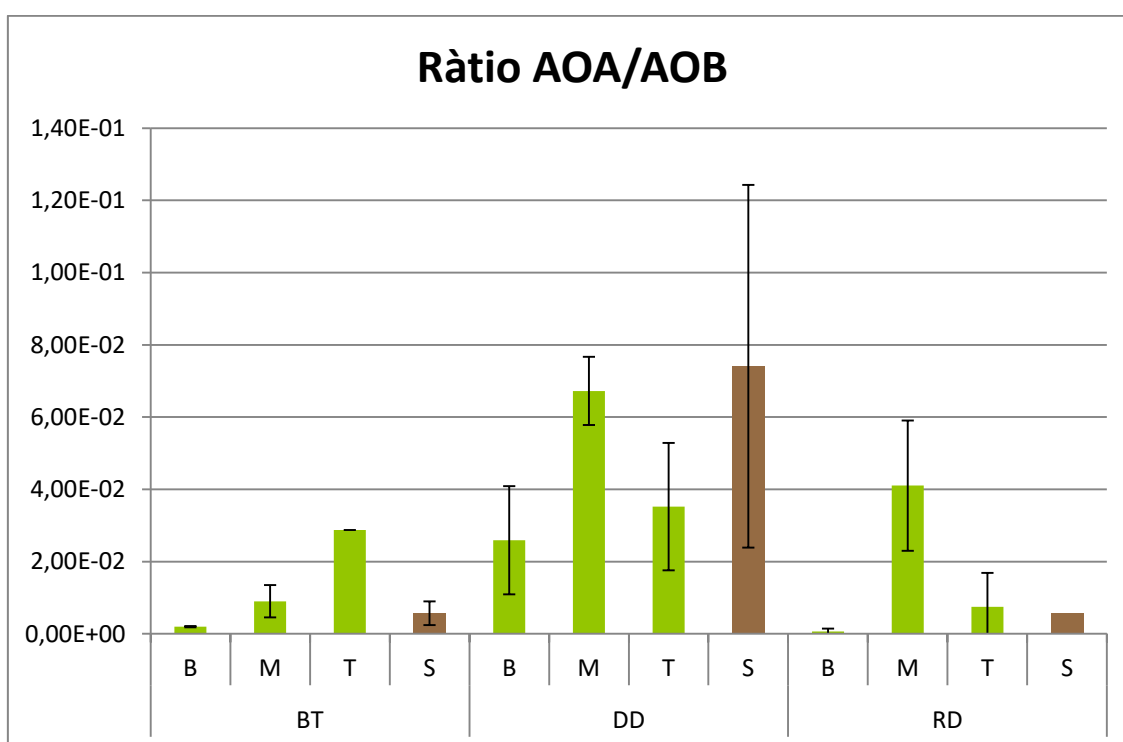


Figura 7. Ràtios del gen *amoA* d'Archaea respecte el gen *amoA* de Bacteria a les diferents parts de l'arrel. B(base), M(mig) i T(punta) de color verd i en el S(sediment) que envolta l'arrel de color marró, dels tres punts de mostreig BT (Bassa de les tortugues), DD (Desembocadura del riu Daró), RD (unió del Rec amb el riu Daró).

5.4. Caracterització de la comunitat microbiana

L'assignació taxonòmica a nivell de fílum [Figura. 8] va manifestar que la majoria de les diferents mostres presenta una comunitat microbiana formada per 5 fílums majoritàriament: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* i *Chloroflexi*, en aquest ordre. S'observà a més, que en una de les mostres del sòl de la desembocadura del riu Daró la comunitat només estava formada pel fílum *Firmicutes*. El fílum d'archaea més abundant a les mostres va ser *Euryarchaeota*.

Com que l'anàlisi taxonòmic [Figura. 8] es va realitzar a un nivell de presència superior a 0,01 no podem visualitzar els fílums concrets de la comunitat de procariotes amoni oxidants. Tot i així, es va determinar l'abundància relativa dels *Nitrosomonas* pertanyent als β -proteobacteris i *Nitrosococcus* pertanyents als γ -proteobacteris [Figura. 9], i l'abundància relativa dels dos fílums d'arqueus amoni oxidants *Thaumarchaeota* i *Crenarchaeota* [Figura. 10]. Es va observar que hi ha una major presència de *Nitrosococcus* que de *Nitrosomonas* en els tres punts de mostreig i que només trobem presència de *Crenarchaeota* en una de les mostres de sediment de la unió del rec des Coll amb el riu Daró.

Segons els resultats de la taxonomia a nivell de fílum no vam poder observar una diferència en l'estructura de la comunitat segons el tipus de sistema aquàtic ni tampoc, segons la part de l'arrel mostrejada.

Taxonomia

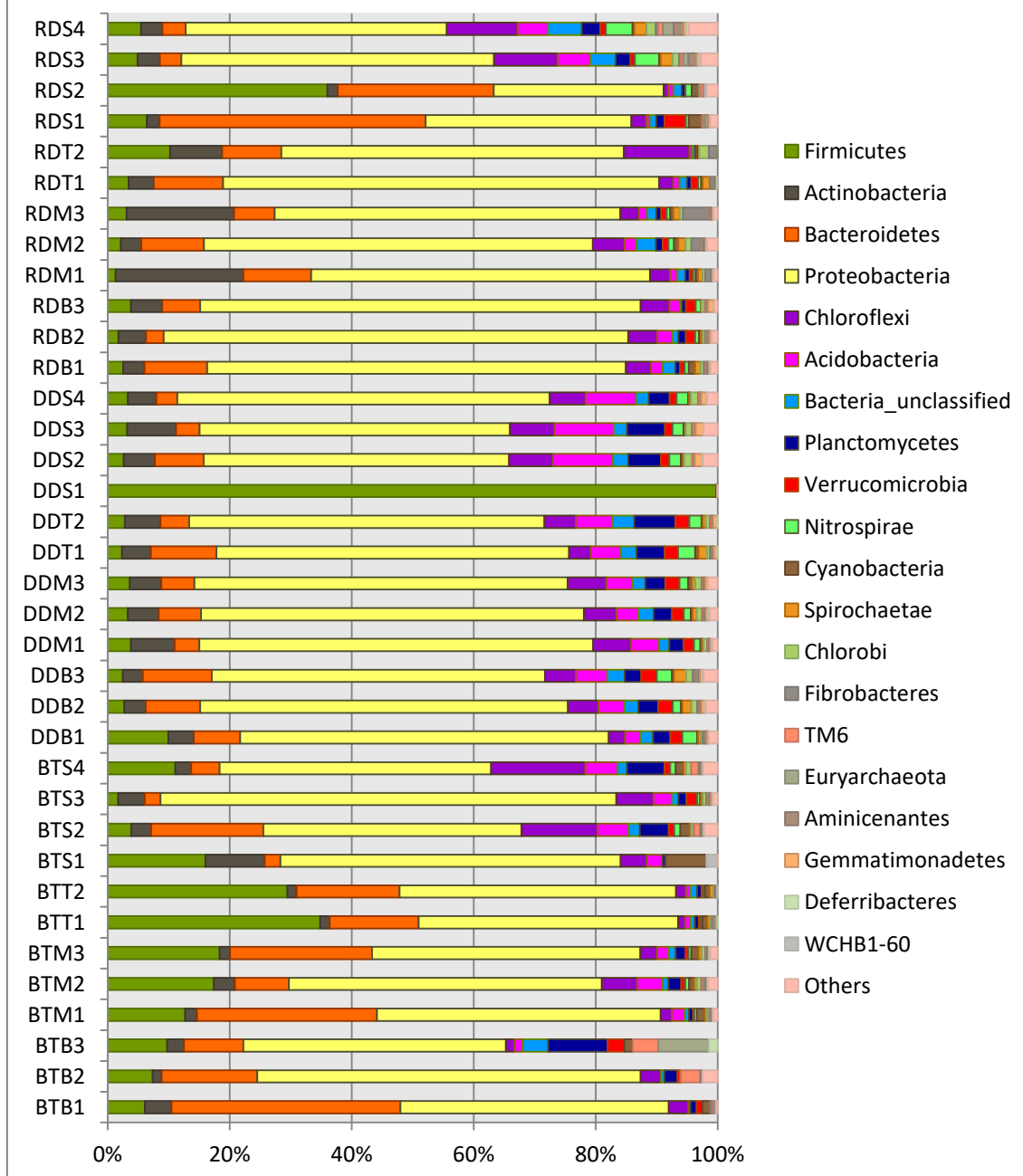


Figura 8. Diversitat microbiana a les diferents mostres dels diferents sistemes aquàtics a nivell de gènere. Les mostres, a l'eix de les ordenades, estan representades segons el lloc de mostreig BT (bassa de les tortugues), DD (desembocadura del Daró) i RD (unió del rec des Coll amb el Daró) i la part de l'arrel mostrada B (Base), M(mig), T(punta), S(sediment). Els números indiquen cadascuna de les rèpliques.

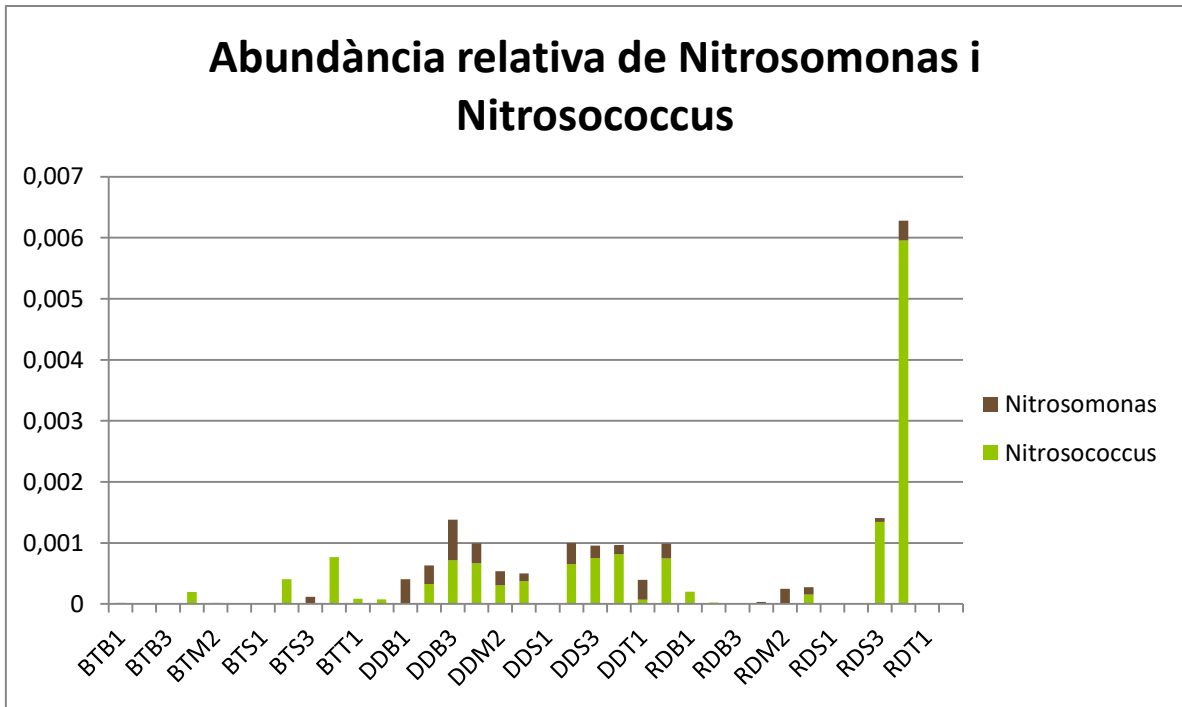


Figura 9. Abundància relativa dels gènere *Nitrosomonas* i *Nitrosococcus* a la comunitat microbiana de les diferents mostres. Les mostres, a l'eix de les coordenades, estan representades segons el lloc de mostreig BT (bassa de les tortugues), DD (desembocadura del Daró) i RD (unió del rec des Coll amb el Daró) i la part de l'arrel mostrejada B (Base), M(mig), T(punta), S(sediment). Els números indiquen cadascuna de les rèpliques.

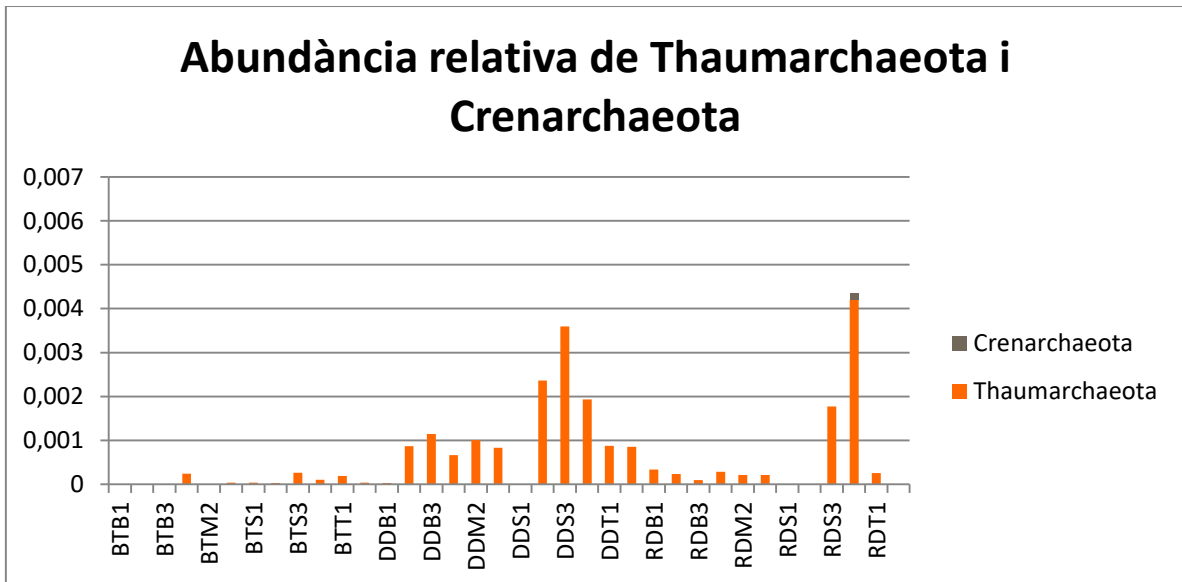


Figura 10. Abundància relativa dels filums *Thaumarchaeota* i *Crenarchaeota* a la comunitat microbiana de les diferents mostres. Les mostres, a l'eix de les coordenades, estan representades segons el lloc de mostreig BT (bassa de les tortugues), DD (desembocadura del Daró) i RD (unió del rec des Coll amb el Daró) i la part de l'arrel mostrejada B (Base), M(mig), T(punta), S(sediment). Els números indiquen cadascuna de les rèpliques

5.5. Anàlisi de la diversitat de la comunitat

5.5.1. Anàlisi de l'alfa diversitat

Ja que el nombre de seqüències a cada mostra afecta directament a l'estimació de la diversitat d'espècies (menys seqüències = menys capacitat de detecció) es va realitzar un *coverage*, que ens ajuda a determinar si la nostra seqüenciació va tenir la suficient profunditat com per poder detectar a la majoria d'espècies possibles dins de la mostra. Els valors del *coverage* es van trobar entre 0,934 i 0,998, per tant, la nostra seqüenciació tenia uns valors acceptables de profunditat per fer l'anàlisi de la comunitat.

Es va poder observar l'alfa diversitat de les mostres a través de l'índex de Shannon, l'índex de Chao1 i el nombre d'OTUs observats [Taula 6]. El valor més alt obtingut per l'índex de Shannon de 5,21 va ser a la mostra de sediment de la desembocadura del Daró i el valor més baix de 0,96 a la mostra de la punta de l'arrel de *Typha angustifolia* de la bassa de les tortugues. En general, s'observà que els valors dels índex de Shannon són més baixos a la punta de l'arrel, la qual cosa indica una menor diversitat en aquesta part respecte a les altres parts mostrejades. En l'anàlisi d'estimació de la riquesa d'espècies mitjançant l'índex Chao1 a una profunditat de seqüenciació de 16000 lectures (per normalitzar) per mostra, es va obtenir que el rang del nombre de OTUs estimats de la biblioteca és de 139 a 1862. A més, es va observar que la riquesa d'espècies més alta obtinguda és a la desembocadura del riu Daró i que en els tres punts de mostreig s'observa una major riquesa a les mostres de sediment.

Taula 6. Anàlisi de l'alfa-diversitat amb les mitjanes de l'índex de Shannon, Chao1 i Sobs, i les seves desviacions estàndard. Punt de mostreig: BT (Bassa tortugues), DD (Desembocadura del Daró) i RD (Unió rec des Coll amb el Daró). Part de l'arrel: B (Base), M (Mig), T (Punta) i S (sediment que envolta l'arrel).

Punt de mostreig	Part arrel	Sobs	Desvest ±	Índex de Shannon	Desvest ±	Índex de Chao1	Desvest ±
BT	B	139	27,91	3,53	0,24	185,90	1,75
	M	452	139,46	2,30	0,77	962,24	459,06
	T	270	94,59	0,96	0,43	908,35	159,33
	S	815	482,14	4,18	0,85	1270,93	754,67
DD	B	1420	774,95	4,67	0,86	2172,97	1337,37
	M	1265	353,65	4,07	1,19	2539,17	1108,28
	T	1220	387,84	3,09	0,53	2681,99	84,84
	S	1862	1226,11	5,21	3,11	2932,62	1914,99
RD	B	929	351,18	4,08	0,45	1375,64	642,94
	M	915	153,30	3,04	0,68	2124,13	126,35
	T	280	241,78	2,64	0,15	360,02	319,48
	S	1055	995,45	4,81	1,93	1311,39	1233,59

El test de Shapiro-Will i el test de Levene van mostrar que les dades no complien amb els paràmetres de normalitat i homocedesticitat. Per tant, es va realitzar un test no-paramètric de Kruskal-Wallis dels diferents sistemes aquàtics [Taula 7] i de cada part de l'arrel mostrejada [Taula 8]. Els resultats estadístics ens van mostrar, que en els diferents sistemes aquàtics l'índex de Chao1 i Sobs són significativament diferents. En efecte, la riquesa d'espècies de cadascun dels 3 punts de mostreig va ser diferent. D'altra banda, quan es va analitzar les diferents parts de l'arrel incloent la part del sediment, només l'índex de Shannon va ser significativament diferent. És a dir, la diversitat microbiana de cada part de l'arrel mostrejada és diferent, i la riquesa d'espècies de cadascuna es considera igual.

Taula 7. Test de Kruskal-Wallis pels índex de Sobs, Chao1 i Shannon, comparant els 3 sistemes aquàtics .

	Sobs	Chao1	Shannon
chi-quadrat	10,2239	11,4063	3,6889
p-valor	0,0061*	0,0034*	0,158

Taula 8. Test de Kruskal-Wallis pels índex de Sobs, Chao1 i Shannon, comparant les diferents parts de l'arrel mostrejades.

	Sobs	Chao1	Shannon
chi-quadrat	2,0427	1,5741	12,1749
p-valor	0,5635	0,6653	0,0053*

5.5.2. Anàlisi de la beta diversitat

Per tal de visualitzar les variacions entre les diferents comunitats segons la composició microbiana es va realitzar una anàlisi de coordenades principals (PCoA) que es va dur a terme incloent totes les mostres després de l'agrupació de les seqüències al 97% d'identitat, sent aquest el llindar que per consens determina els límits que pertanyen a una mateixa espècie (Yarza P. i col. 2008). Els eixos formats pels dos components de la anàlisi axis 1 i axis 2, proporcionen un espai el qual, la proximitat entre les mostres indica una composició microbiana de la comunitat similar. Com es pot observar [Figura 11], si comparàvem punts de mostreig, cadascun dels sistemes aquàtics presentava una agrupació de l'estructura de la comunitat diferent però, la bassa de les tortugues va ser la que presentava una composició de la comunitat microbiana més diferents als altres dos sistemes mostrejats.

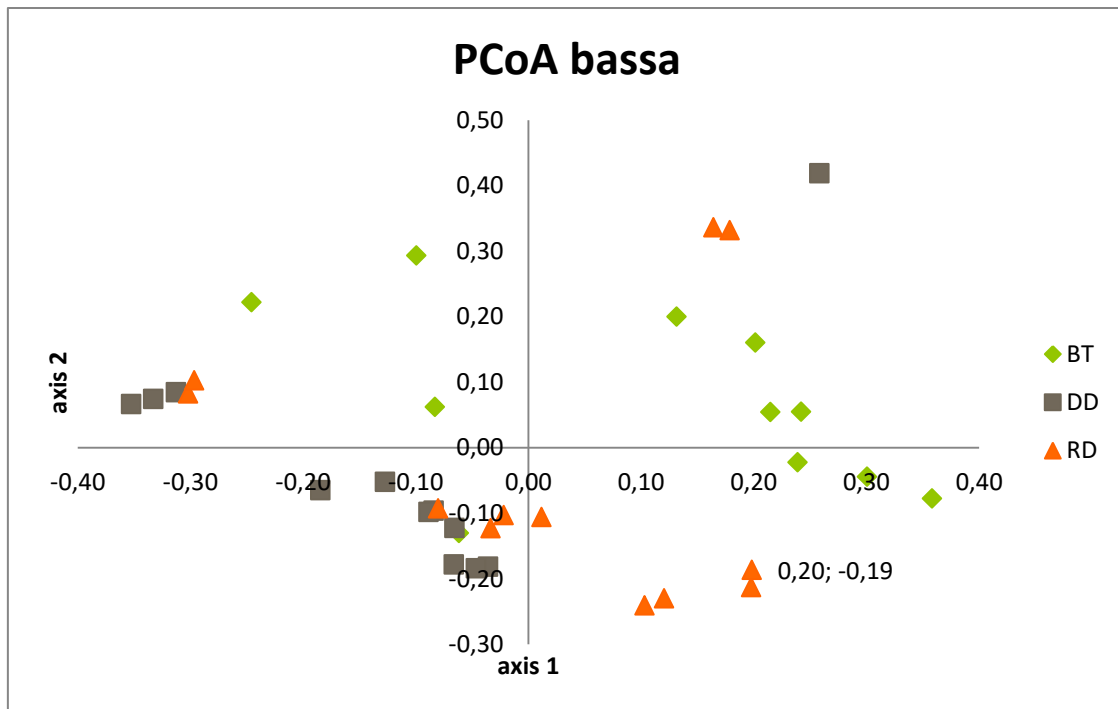


Figura 11. Anàlisi de coordenades principals (PCoA) de les mostres de de DNA agrupades segons el tipus de sistema aquàtic. La bassa de les tortugues (BT) correspon al símbol rombe verd, la desembocadura del riu Daró (DD) correspon al quadrat gris i la unió del rec des Coll amb el riu Daró (RD) és el triangle taronja.

D'altra banda, si observem l'anàlisi de les comunitats segons la part de l'arrel de *Typha angustifolia* [Figura 12], ens va mostrar que la part del sediment que envolta l'arrel s'agrupava de manera diferent que la part de l'arrel. A més a més, també es va poder observar que tant la part de la base, com la part mitja i de la punta de l'arrel presentaven una estructura diferent de les comunitats.

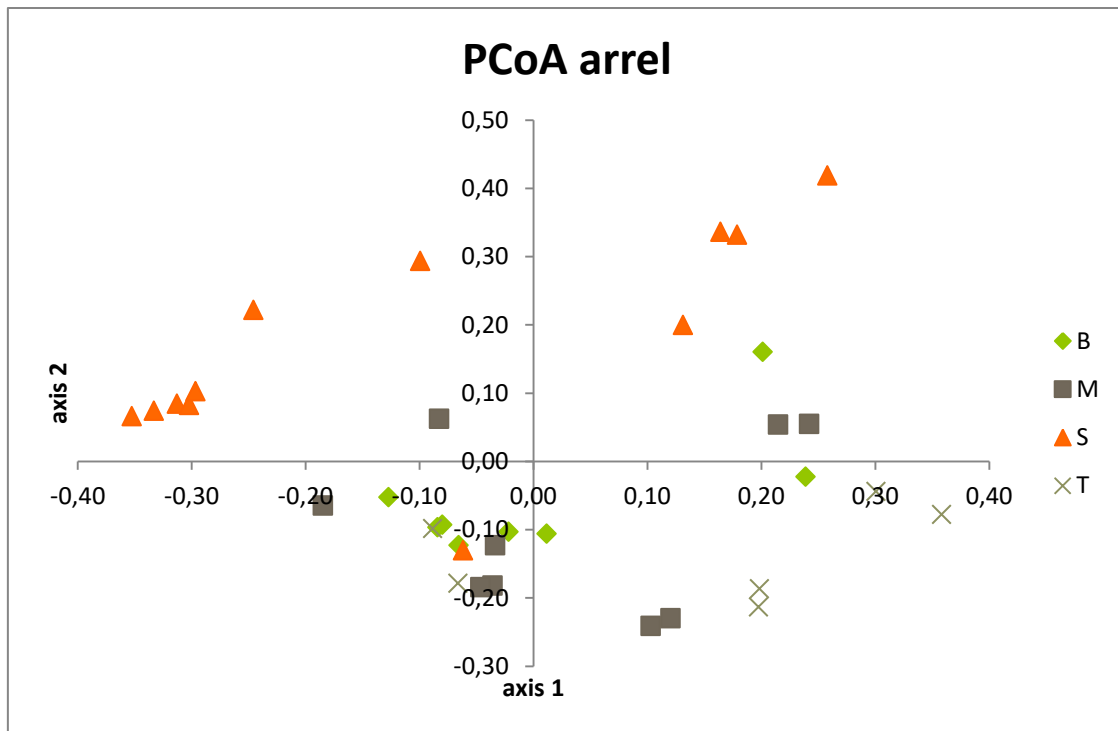


Figura 12. Anàlisi de coordenades principals (PCoA) de les mostres de de DNA agrupades segons la part de *Typha angustifolia* que es va mostrejar. La part del sediment (S) correspon al triangle taronja, la part de la base de l'arrel (B) correspon al rombe verd, la part mitja de l'arrel (M) correspon al quadrat gris i la part de la punta (T) correspon a la creu gris.

Per determinar si la diversitat de la composició microbiana de les comunitats era estadísticament diferent, es va fer un anàlisi estadístic ANOSIM, tenint en compte que les mostres eren significativament diferents si tenien un p -valor $< 0,001$. Primerament, es va analitzar les mostres agrupades segons el tipus de sistema aquàtic: bassa de les tortugues, desembocadura del riu Daró i la unió del rec des Coll amb el Daró [Taula. 9]. L'anàlisi estadística ens va mostrar que la bassa de les tortugues i la desembocadura del riu Daró són significativament diferents d'igual manera que, la desembocadura del riu Daró amb la unió del rec des Coll amb el Daró. Per tant, el punt de mostreig analitzat significativament diferent va ser la desembocadura del riu Daró.

Al contrari, quan es va comparar les mostres segons la part de l'arrel (base, mig, punta i sediment) sense tenir en compte el sistema aquàtic d'on provenien [Taula.10] no s'observà cap diferència significativa. Tot i això, els valors de R, indicador de la robustesa del factor, indiquen que és un bon factor per comparar grups ja que es trobava entre els valors de 0,06 i 0,28. Per consegüent, observarem que les comparacions entre Base-Mig de l'arrel és la que presentava un p -valor més baix de 0,016 i les comparacions entre la Mig-Punta el p -valor més alt de 0,237 el qual, ens indicà que aquestes últimes parts són més similars.

Taula 9. Anàlisi estadística ANOSIM de les mostres agrupades segons el tipus de sistema aquàtic. BT (Bassa de les tortugues), DD (Desembocadura del riu Daró) i RD (unió del rec des Coll amb el Daró). Les comparacions BT-DD i DD-RD són significativament diferents amb un p-valor <0,001.

Comparacions	R-valor	P-valor
BT-DD	0.379038	<0.001*
BT-RD	0.0951665	0.069
DD-RD	0.210701	<0.001*

Taula 10. Anàlisi estadística ANOSIM de les mostres agrupades segons la part de l'arrel mostrejada. B (Base de l'arrel), M (part mitja de l'arrel) , T(punta de l'arrel) i S(sediment que envolta l'arrel). Cap de les comparacions són significativament diferents.

Comparacions	R-valor	P-valor
B-M	0.24349	0.016
B-S	0.121011	0.097
B-T	0.276163	0.027
M-S	0.185911	0.018
M-T	0.0653595	0.237
S-T	0.246228	0.037

6. Discussió

Ens aquest estudi s'ha analitzat la comunitat de bacteris i arqueus amoni oxidants en l'arrel de *Typha angustifolia* en 3 tipus de sistemes aquàtics diferents. A partir de la tècnica de qPCR es va quantificar el gen funcional *amoA*, responsable de l'oxidació de l'amoni, i el gen 16S rRNA en bacteris i arqueus. Les quantificacions d'ambdós gens van ser superiors en bacteris, respecte dels arqueus, en tots els punts de mostreig. Per tant, això ens indicava que la comunitat microbiana estudiada està dominada per bacteris. En concret, si analitzàvem la comunitat amoni oxidant, estimant la importància relativa del gen funcional *amoA* en bacteris i arqueus [Figura 5; Figura 6], ens va indicar que hi havia més abundància relativa dels AOA en els tres punts de mostreig tot i que, els AOB es trobaven en major quantitat. A més, si s'analitzava la importància relativa del gen *amoA-archaea* respecte el gen *amoA-bacteria* [Figura. 7] també va obtenir uns resultats dominants de AOA, a excepció de la part de la base de l'arrel en la unió del rec des Coll amb el Daró. En general, els resultats estadístics van mostrar que hi havia diferències significatives dels AOA i dels AOB quan comparàvem els diferents punts de mostreig però no quan es comparaven les diferents parts de l'arrel. Algunes investigacions determinen que els AOA estan millor adaptats que els AOB en condicions microaeròfiles a la rizosfera de plantes terrestres (Herrmann et al., 2008), per això es suggereix que els AOA juguen un paper important en la nitrificació de certs sols (Chen et al., 2008; Leininger et al., 2006), en els estuaris (Zhang et al., 2012), a la rizosfera dels macròfits (Herrmann et al., 2008), i en alguns ambients aquàtics (Beman et al., 2008; Li et al., 2011), on la nitrificació està més relacionada amb l'estructura i abundància de la comunitat d'arqueus amoni oxidants (Herrmann et al., 2008; Leininger et al., 2006; Li et al., 2011). Tot i així, altres estudis suggereixen que els AOB són més importants per la oxidació de l'amoni a pesar de que, els AOA són més abundants (Jia y Conrad, 2009). Per tant, l'abundància dels AOA enfront els AOB pot no determinar un paper més important dels arqueus en la oxidació de l'amoni (Jia y Conrad, 2009; Sims et al., 2012). Això es degut a que, la quantificació basada en el gen *amoA* no proporciona una evidència de l'activitat oxidant del l'amoni (Glaser et al. 2010) només ens indica el nombre de còpies del gen en el total de les seqüències estudiades. Per tant, només amb els resultats obtinguts de les quantificacions del gen *amoA* per qPCR no vam poder caracteritzar la comunitat de nitrificants de *Typha angustifolia* al Baix Ter.

Per aquest motiu, els resultats de qPCR es van complementar amb els resultats de seqüenciació massiva on podíem analitzar la població de procariotes a través del marcador filogenètic 16S rRNA. Els resultats taxonòmics [Figura. 8] van mostrar que la comunitat microbiana estudiada estava dominada pel fílum de *Proteobacteria*, seguit dels fílums *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* i *Chloroflexi*. D'altra banda, es coneix que la comunitat AOB d'aigües continentals està formada per la classe β -proteobacteris, incloent *Nitrosomonas* i *Nitrosospira* i la classe γ -proteobacteris on trobem el gènere de *Nitrosococcus* i la comunitat AOA està formada majoritàriament per *Crenarchaeota* i *Thaumarchaeota*. Per consegüent, es va analitzar l'abundància relativa dels gèneres de *Nitrosomonas* i *Nitrosococcus* [Figura 9] ja que, no es va trobar *Nitrosospira* en cap de les mostres; i l'abundància relativa dels fílums *Thaumarchaeota* i *Crenarchaeota* [Figura 10]. El fet de no trobar *Nitrosospira* a les mostres, podria ser degut a que *Nitrosomonas* i *Nitrosococcus* tenen una taxa de creixement més alta i són més eficients per realitzar nitrificació, no deixant lloc al creixement de *Nitrosospira* (Schramm et al, 2000). Quan es va comparar a nivell de fílums amoni oxidants, entre bacteris i arqueus, el fílum de *Proteobacteris* dominava, ja que *Thaumarchaeota* i *Crenarchaeota* es trobaven en proporcions molt baixes [Figura 12]. El fílum d'arqueus dominant a les mostres va ser *Euryarchaeota* el qual, comprén un grup molt ampli d'arqueus incloent espècies halòfiles extremes, metanògenes, acidòfiles extremes, hipertermòfiles i planctòniques. La falta de presència d'espècies AOA també es degut a la falta de classificació dels arqueus, per la seva gran dificultat de cultiu i aïllament i la seva posterior caracterització. Per aquest motiu, es va poder estudiar amb més profunditat la població de AOB, indicant que en general hi ha més espècies de *Nitrosococcus* que de *Nitrosomonas* [Figura 11]. Normalment es sol trobar més espècies de *Nitrosomonas* que de *Nitrosococcus* a les comunitats amoni oxidants, però els nostres resultats van mostrar el contrari en tots els sistemes aquàtics. Això pot ser degut a que l'espècie *Nitrosococcus* família dels *Chromatiaceae*, poden realitzar l'oxidació de l'amoni, la del nitrit i recentment també s'ha identificat com espècie anamox (Campbell et al, 2011), reunint així unes característiques per formar poblacions en ambients més diversos.

Els valors obtinguts de diversitat i estructura de la comunitat microbiana analitzada [Taula. 6] van mostrar que, la part del sediment que envolta l'arrel presenta major diversitat i, que la punta de l'arrel va ser la zona amb menys diversitat. D'igual manera, la riquesa d'espècies més alta va ser a la part del sediment. Així mateix, la anàlisi estadística de Kruskal-Wallis ens va mostrar que la diversitat de la comunitat microbiana era diferent en les diferents parts de l'arrel [Taula 8], i que la riquesa

d'espècies entre els diferents sistemes aquàtics també era diferent. Per tant, realitzant una anàlisi amb el marcador 16S rRNA, la diversitat microbiana a cada part de l'arrel mostrejada va ser significativament diferent. A més, tot i que l'anàlisi estadístic ANOSIM no ho va confirmar, es va observar que l'anàlisi de coordenades principals (PCoA) agrupava de manera diferent les diferents parts de l'arrel mostrejades [Figura. 11;Figura. 12], on la part del sediment era el més divers i per tant, observàrem que la comunitat microbiana s'estructura de manera diferent al llarg de l'arrel de *Typha angustifolia*. El que sí es va afirmar, és que la desembocadura del riu Daró era significativament diferent als altres dos punts de mostreig, cosa que concordava amb els resultat de riquesa amb els valors més alts de l'índex de Chao1. També, relacionant els resultat de qPCR la desembocadura del Daró va ser el punt de mostreig amb menys presència del gen *amoA*, però amb la ràtio més alta d'AOA/AOB. Així mateix, si observàvem els paràmetres fisicoquímics dels diferents punts mostreig, la desembocadura del Daró era la que presentava major temperatura i uns valors de pH i conductivitat entremitjos. El conjunt de tots aquests resultats ens va indicar que, la Desembocadura del riu Daró presentava una condicions fisicoquímiques òptimes i estables, per al creixement de moltes poblacions de microorganismes.

Estudis anteriors han demostrat que les diferències d'alliberació d'oxigen al llarg de l'arrel pot ser causant de les diferències en els patrons de distribució dels AOA i AOB i per tant, probablement influeixi en l'abundància d'oxidants de l'amoni associats a la rizosfera (Herrmann et al.,2009). Tot i així, els nostres resultats van ser incapaços de confirmar la influència de l'oxigen alliberada a la rizosfera de *Typha angustifolia* en la ratio dels AOA/AOB. Els nostres resultats realitzats amb el marcador filogenètic 16S rRNA van mostrar una diversitat diferent de la comunitat microbiana en cada part de l'arrel de *Typha angustifolia* cosa que, ens pot informar que la difusió d'oxigen al llarg de l'arrel influencia a tota la comunitat microbiana. Per consegüent, podem dir que els paràmetres fisicoquímics dels sistemes aquàtics influeixen més a la comunitat que no pas la difusió d'oxigen al llarg de l'arrel. Val a dir, que aquesta anàlisi de diversitat s'ha realitzar a través del marcador 16S rRNA i per tant, s'observa el conjunt de tota la comunitat. Suggerim, que si s'analitzés la diversitat a través del marcador *amoA*, es podria observar la influència de l'oxigen alliberat a la rizosfera amb la comunitat amoni oxidant.

Varis autors han demostrat que hi ha factors abiòtics incloent pH, salinitat, disponibilitat d'aigua, matèria orgànica i factors biòtics com el tipus de planta, etapa de desenvolupament de la planta, edat de l'arrel i l'arquitectura de l'arrel que afecten a les estructures de les comunitats microbianes de la rizosfera (Berg et al., 2009, , Nie et al., 2009, Prashar et al. 2014). Segons els nostres resultats obtinguts, els paràmetres de pH, temperatura i conductivitat de l'aigua afectaven directament a l'estructura i diversitat de la comunitat microbiana de la rizosfera de *Typha angustifolia*. No obstant, els nostres resultats no han pogut determinar que una alta conductivitat disminueix la nitrificació i la ràtio entre AOA/AOB, tal i com han demostrat estudis anteriors (Moeller, 2001; Santoro et al., 2008). Sinó que han mostrat el contrari, la unió del rec des Coll amb el Daró el qual presenta una menor conductivitat és el que té una ràtio més baixa entre AOA/AOB i la bassa de les tortugues amb la màxima conductivitat presenta una ràtio entre AOA/AOB superior a la unió del rec des Coll amb el Daró, però inferior a la desembocadura del Daró.

En resum, els resultats ens van mostrar que el punt de mostreig amb les concentracions d'oxigen més baixes (bassa de les tortugues) és el que presentava els valors d' α -diversitat i riquesa més baixos i el punt de mostreig amb uns valors de pH més alts (unió rec des Coll amb el Daró) va ser el que va presentar unes abundàncies majors de les ràtios *amoA*/16S rRNA per bacteris i arqueus.

7. Conclusions

In summary, when we analysed the relative abundances of the phylogenetic marker *amoA* we observed differences of ammonia oxidizing community at level of aquatic system but not at level of parts of the roots of *Typha angustifolia* sampled. However, when we analysed the community with the 16S rRNA biomarker we could find a connection between the diffusion of oxygen along the root and the diversity of the community. Similarly, when comparing the different aquatic systems, we have been able to observe a significant difference with both markers. In conclusion, the physico-chemicals parameters of the aquatic ecosystem such as conductivity, temperature and dissolved oxygen influence the microbial community more than the diffusion of oxygen from the root.

8. Bibliografía

- Abell, G. C., Banks, J., Ross, D. J., Keane, J. P., Robert, S. S., Reville, A. T., & Volkman, J. K. (2011). Effects of estuarine sediment hypoxia on nitrogen fluxes and ammonia oxidizer gene transcription. *FEMS microbiology ecology*, 75(1), 111-122.
- Andrade Ochoa, S., Erosa de la Vega, G., & Nevárez Moorillón, G. V. (2015). Amonio-oxidasas bacterianas y arqueales involucradas en el ciclo del nitrógeno. *Terra Latinoamericana*, 33(3), 233-245.
- Armstrong, W., Cousins, D., Armstrong, J., Turner, D. W., & Beckett, P. M. (2000). Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modelling study with *Phragmites australis*. *Annals of Botany*, 86(3), 687-703.
- Bañeras L, Ruiz-Rueda O, López-Flores R, Quintana XD, Hallin S (2012) The role of plant type and salinity in the selection for the denitrifying community structure in the rhizosphere of wetland vegetation. *International Microbiology* 15:89–99
- Beman JM, Francis CA (2006) Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahía del Tobari, Mexico. *Appl Environ Microbiol* 72:7767–7777
- Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS microbiology ecology*, 68(1), 1-13.
- Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P (2008) Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat Rev Microbiol* 6(3):245–252
- Bustin, S.A., Nolan, T. (2004). *The Real-time PCR Encyclopaedia A–Z of Quantitative PCR*. (p. Template handling, preparation, and quantification).
- Camargo, J. A., & Alonso, A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Revista Ecosistemas*, 16(2).
- Campbell, M. A., Chain, P. S., Dang, H., El Sheikh, A. F., Norton, J. M., Ward, N. L., ... & Klotz, M. G. (2011). *Nitrosococcus watsonii* sp. nov., a new species of marine obligate ammonia-oxidizing bacteria that is not omnipresent in the world's oceans: calls to validate the names 'Nitrosococcus halophilus' and 'Nitrosomonas mobilis'. *FEMS microbiology ecology*, 76(1), 39-48.
- Caporaso, J.G., Bittinger, K., Bushman, F.D., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Knight, R., 2010a. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26, 266–267.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pena, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., 2010b. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336.
- Chen XP, Zhu YG, Xia Y, Shen JP, He JZ (2008) Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil? *Environ Microbiol* 10:1978–1987
- Dalsgaard, T., Thamdrup, B., & Canfield, D. E. (2005). Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. *Research in Microbiology*, 156(4), 457-464.
- Duarte, G. F., Rosado, A. S., Seldin, L., Keijzer-Wolters, A. C., & Van Elsas, J. D. (1998). Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community. *Journal of Microbiological Methods*, 32(1), 21–29.

Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.

Faulwetter, J. L., Gagnon, V., Sundberg, C., Chazarenc, F., Burr, M. D., Brisson, J., ... & Stein, O. R. (2009). Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: a review. *Ecological engineering*, 35(6), 987-1004.

Forshay, K. J., & Dodson, S. I. (2011). Macrophyte presence is an indicator of enhanced denitrification and nitrification in sediments of a temperate restored agricultural stream. *Hydrobiologia*, 668(1), 21-34.

Fox, J., Ash, M., Boye, T., Calza, S., Chang, A., Grosjean, P., ... & Messad, S. (2007). Rcmdr: R commander. *R package version*, 1-3.

Francis, C. A., Beman, J. M., & Kuypers, M. M. (2007). New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME journal*, 1(1), 19-27.

Glaser, K., Hackl, E., Inselsbacher, E., Strauss, J., Wanek, W., Zechmeister-Boltenstern, S., & Sessitsch, A. (2010). Dynamics of ammonia-oxidizing communities in barley-planted bulk soil and rhizosphere following nitrate and ammonium fertilizer amendment. *FEMS microbiology ecology*, 74(3), 575-591.

González, P., Quintans, P., Vizcaíno, M., Miguel, R., González, J., Pérez, J., García, R., 2010. Estudio de la inhibición del proceso de nitrificación como consecuencia de la acumulación de metales en el fango biológico de la EDAR de León y su alfoz. *Tecnología del Agua* 322: 28-38.

Hartman WH, Richardson CJ, Vilgalys R, Bruland GL (2008) Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:17842–17847

Herrmann M, Saunders AM, Schramm A (2008) Archaea dominate the ammonia-oxidizing community in the rhizosphere of the freshwater macrophyte *Littorella uniflora*. *Appl Environ Microbiol* 74:3279–3283

Hill, T. C., Walsh, K. A., Harris, J. A., & Moffett, B. F. (2003). Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS microbiology ecology*, 43(1), 1-11.

Hooper, A. B., Vannelli, T., Bergmann, D. J., & Arciero, D. M. (1997). Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71(1), 59-67.

Horn, M. A., Drake, H. L., & Schramm, A. (2006). Nitrous oxide reductase genes (nosZ) of denitrifying microbial populations in soil and the earthworm gut are phylogenetically similar. *Applied and environmental microbiology*, 72(2), 1019-1026.

Humbert, S., Zopfi, J., & Tarnawski, S. E. (2012). Abundance of anammox bacteria in different wetland soils. *Environmental Microbiology Reports*, 4(5), 484-490.

Jia, Z., & Conrad, R. (2009). Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental microbiology*, 11(7), 1658-1671.

Könneke, M., A. E. Bernhard, J. R. de la Torre, C. B. Walker, J. B. Waterbury, and D. A. Stahl. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437:543–546.

Laws, E. A. (2000). *Aquatic pollution: an introductory text*. John Wiley & Sons.

Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, Prosser JI, Schuster SC, Schleper C (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442:806–809

- Li, M., Cao, H., Hong, Y., & Gu, J. D. (2011). Spatial distribution and abundances of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in mangrove sediments. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(4), 1243-1254.
- Llirós, M., Casamayor, E. O., & Borrego, C. (2008). High archaeal richness in the water column of a freshwater sulfurous karstic lake along an interannual study. *FEMS Microbiology Ecology*, 66, 331–342. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00583.x
- Llirós, M., Trias, R., Borrego, C., & Bañeras, L. (2014). Specific archaeal communities are selected on the root surfaces of *Ruppia* spp. and *Phragmites australis*. *Wetlands*, 34(2), 403-411.
- Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., & Knight, R. (2011). UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME journal*, 5(2), 169.
- Madsen, E. L. (2000). Nucleic-acid characterization of the identity and activity of subsurface microorganisms. *Hydrogeology Journal*, 8(1), 112-125.
- Maltais-Landry, G., Maranger, R., Brisson, J., & Chazarenc, F. (2009). Nitrogen transformations and retention in planted and artificially aerated constructed wetlands. *Water research*, 43(2), 535-545.
- Mitsch, W. J., & Gosselink, J. G. (2000). The value of wetlands: importance of scale and landscape setting. *Ecological economics*, 35(1), 25-33.
- Moeller, F. U. (2011). Biogeochemical and molecular biological characterization of nitrogen cycle processes in the Columbia river and estuary.
- Nie, M., Zhang, X. D., Wang, J. Q., Jiang, L. F., Yang, J., Quan, Z. X., ... & Li, B. (2009). Rhizosphere effects on soil bacterial abundance and diversity in the Yellow River Deltaic ecosystem as influenced by petroleum contamination and soil salinization. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(12), 2535-2542.
- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. *A-Z of Quantitative PCR*, 87–112. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s10551-011-0963-1
- Prashar, P., Kapoor, N., & Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13(1), 63-77.
- Ruiz-Rueda, O., Hallin, S., & Bañeras, L. (2009). Structure and function of denitrifying and nitrifying bacterial communities in relation to the plant species in a constructed wetland. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(2), 308-319.
- Santoro, A. E., Francis, C. A., De Siewes, N. R., & Boehm, A. B. (2008). Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary. *Environmental Microbiology*, 10(4), 1068-1079.
- Schloss, P. D. (2010). The effects of alignment quality, distance calculation method, sequence filtering, and region on the analysis of 16S rRNA gene-based studies. *PLoS Comput Biol*, 6(7), e1000844.
- Schloss, P. D., & Westcott, S. L. (2011). Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Applied and environmental microbiology*, 77(10), 3219-3226.
- Schramm A, De Beer D, Gieseke A, Amann R (2000) Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm. *Environmental microbiology* 2: 680-686.
- Sims, A., Horton, J., Gajaraj, S., McIntosh, S., Miles, R. J., Mueller, R., ... & Hu, Z. (2012). Temporal and spatial distributions of ammonia-oxidizing archaea and bacteria and their ratio as an indicator of oligotrophic conditions in natural wetlands. *Water research*, 46(13), 4121-4129.

- Teske A, Sørensen KB (2008) Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: Have we caught them all? *The ISME Journal* 2: 3–18
- Trias, R., Ruiz-Rueda, O., García-Lledó, A., Vilar-Sanz, A., López-Flores, R., Quintana, X. D., ... & Bañeras, L. (2012). Emergent macrophytes act selectively on ammonia-oxidizing bacteria and archaea. *Applied and environmental microbiology*, 78(17), 6352-6356.
- Trias, R., García-Lledó, A., Sánchez, N., López-Jurado, J. L., Hallin, S., & Bañeras, L. (2012). Abundance and composition of epiphytic bacterial and archaeal ammonia oxidizers of marine red and brown macroalgae. *Applied and environmental microbiology*, 78(2), 318-325.
- Vargha, A., & Delaney, H. D. (1998). The Kruskal-Wallis test and stochastic homogeneity. *Journal of Educational and Behavioral Statistics*, 23(2), 170-192.
- Vitousek, P. M., Aber, J. D., Howarth, R. W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W., ... & Tilman, D. G. (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological applications*, 7(3), 737-750.
- Vymazal, J. (2007). Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the total environment*, 380(1), 48-65.
- Wagner, R. (1994). The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth. *Archives of Microbiology*, 161, 100–106.
- Ward, B. B., Arp, D. J., & Klotz, M. G. (Eds.). (2011). Nitrification. *American Society for Microbiology Press*.
- Zhang, L. M., Hu, H. W., Shen, J. P., & He, J. Z. (2012). Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *The ISME journal*, 6(5), 1032-1045.
- Zhou, X., Zhang, J., Li, Y., Liu, B., Chu, J., Wang, M., & He, Z. (2016). Distribution characteristics of ammonia oxidizing microorganisms in rhizosphere sediments of cattail. *Ecological Engineering*, 88, 99-111.