

# Microscopía convencional *versus* FISH en la identificación y abundancia de los morfotipos filamentosos 0803, 0914 y 0092 en fangos activos

**Ana Belén Andújar González** licenciada en Ciencias Ambientales, Grupo de Química y Microbiología del Agua del Instituto Universitario de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) de la Universidad Politécnica de Valencia

**Andrés Zornoza Zornoza** licenciado en Ciencias Químicas y personal investigador del Grupo de Química y Microbiología del Agua del Instituto Universitario de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) de la Universidad Politécnica de Valencia

**Marta Lledías Aparici** ingeniero agrónomo, Grupo de Química y Microbiología del Agua del Instituto Universitario de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) de la Universidad Politécnica de Valencia

**José Luis Alonso Molina** doctor en Ciencias Biológicas y personal investigador del Grupo de Química y Microbiología del Agua del Instituto Universitario de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) de la Universidad Politécnica de Valencia

El crecimiento excesivo de bacterias filamentosas en fangos activos origina problemas de explotación en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). Por ello, su identificación y cuantificación correcta es primordial en el control del proceso de las EDAR. Algunas bacterias filamentosas que pertenecen al phylum *Chloroflexi* son muy comunes y abundantes en las EDAR urbanas e industriales, como por ejemplo los morfotipos 0803, 0914 y 0092. Debido a la escasa especificidad de la microscopía convencional se pueden producir, en algunas ocasiones, errores en la identificación y cuantificación de bacterias filamentosas. Por ello, el objetivo de este estudio fue comparar la abundancia de los morfotipos 0803, 0092 y 0914 obtenida con la microscopía convencional y la técnica de hibridación *in situ* con sondas marcadas con fluoróforos (FISH) en muestras procedentes de 4 EDAR. Los resultados obtenidos han permitido establecer que existen diferencias significativas al comparar los resultados de identificación y cuantificación entre ambas técnicas. Además, la técnica FISH permitió diferenciar los morfotipos 0914 y 0803.

#### Palabras clave

EDAR, fangos activos, bacterias filamentosas, phylum *Chloroflexi*.

#### *Conventional microscopy versus FISH in the identification and quantification of the morphotypes 0803, 0914 and 0092 in activated sludges*

*Excessive growth of filamentous bacteria in activated sludge wastewater treatment plants (WWTP) causes serious operational problems. Therefore, their identification and quantification is essential in the process control. Some filamentous bacteria that belong to the phylum Chloroflexi are very common and abundant in urban and industrial WWTP, as for example the morphotypes 0803, 0914 and 0092. Due to the low specificity of conventional microscopy, occasionally may produce errors in the identification and quantification of filamentous bacteria. Therefore, the aim of this study was to compare the abundance of morphotypes 0803, 0092 and 0914 obtained by conventional microscopy and fluorescence *in situ* hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides (FISH) in samples from four WWTP. The results have established that there are significant differences when comparing the results of identification and quantification between both techniques. Besides, the FISH technique allowed differentiate the morphotypes 0914 and 0803.*

#### Keywords

WWTP, activated sludge, filamentous bacteria, phylum *Chloroflexi*.



## 1. Introducción

Los microorganismos filamentosos son miembros, junto con protistas y metazoos, de la microbiota de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), y desempeñan un papel esencial en la formación flocular (Madoni *et al.*, 2000). Una presencia moderada de filamentos contribuye a una buena formación del flóculo del fango activo y a la captura de partículas pequeñas durante la sedimentación del fango, generando así un efluente de mayor calidad.

El sistema de identificación convencional para las bacterias filamentosas más frecuentes en fangos activos fue publicado por Eikelboom en 1975. Posteriormente, Eikelboom y van Buijsen (1983) y Jenkins *et al.* (1993) desarrollaron unas claves de identificación dicotómicas en función de una serie de características morfológicas y reactivas a las tinciones diferenciales clásicas, como por ejemplo Gram y Neisser. De esta forma, las bacterias filamentosas fueron agrupadas bajo características comunes, estableciéndose su denominación principalmente con un código de cuatro cifras precedido por la denominación 'tipo o morfotipo' y, en algunos casos, a nivel de género.

Las versiones más actualizadas por Eikelboom (2000, 2006) y Jenkins *et al.* (2004) son una modificación de las claves de identificación propuestas por Eikelboom y van Buijsen (1983), donde se recogen las bacterias filamentosas que con mayor frecuencia aparecen en fangos activos. El uso de estas claves de identificación se encuentra limitado debido a que la morfología y las respuestas a las diferentes tinciones diferenciales pueden variar en virtud del amplio abanico de factores ambientales a los que se encuentran sometidas las bacterias (polimorfismo). En EDAR industriales de fangos activos se

pueden encontrar incluso morfotipos distintos de urbanas (Seviour, 1999; Eikelboom, 2006).

El empleo en los últimos años de técnicas moleculares que determinan las secuencias del gen 16S rDNA (Seviour y Blackall, 1999), aplicadas al estudio de las bacterias filamentosas, está comenzando a definir su verdadera relación evolutiva estableciendo su estado filogenético. La técnica de hibridación *in situ* con sondas de 16S rDNA marcadas con fluoróforos (FISH) es una de las técnicas moleculares más conocidas que permite, mediante microscopía de fluorescencia, identificar con una elevada especificidad los microorganismos en muestras en su medio natural (Björnsson *et al.*, 2002). La especificidad de las sondas puede ser ajustada a diferentes niveles taxonómicos, como son dominio, phylum, clase, familia, género o especie para la identificación de las bacterias en sus diferentes comunidades naturales (Amann *et al.*, 1995).

La proliferación excesiva de bacterias filamentosas genera problemas de explotación y causa serios problemas de separación en el clarificador secundario. Estos problemas pueden clasificarse en dos grandes grupos, que pueden aparecer de forma separada o conjunta; esponjamiento o *bulking* y espumación o *foaming*. En este sentido, la identificación correcta de las bacterias filamentosas presentes es primordial en el control del proceso de explotación de la EDAR.

Las bacterias filamentosas que representan el phylum *Chloroflexi* son muy comunes y abundantes en EDAR urbanas e industriales (Beer *et al.*, 2002; Björnsson *et al.*, 2002; Kragelund *et al.*, 2007; Speirs *et al.*, 2009). Los filamentos del phylum *Chloroflexi* pueden constituir hasta el 30% del biovolumen total en las plantas de eliminación de nutrientes (Beer *et al.*,

2006; Kong *et al.*, 2008; Morgan-Sagastume *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*, 2010) y es, a menudo, el phylum de organismos filamentosos más abundante. Este phylum juega un papel importante en la formación del flóculo (Kragelund *et al.*, 2011) y en la aparición de episodios de *bulking* de forma ocasional (Jenkins *et al.*, 2004; Kragelund *et al.*, 2006).

Dentro del phylum *Chloroflexi* se han descrito cuatro clases bien diferenciadas: *Anaerolineae*, *Dehalococcoidetes*, *Chloroflexi* y *Thermomicrobia* (Hugenholtz y Stackebrandt, 2004), siendo la más abundante en fangos activos la clase *Anaerolineae* (Hugenholtz *et al.*, 1998; Sekiguchi *et al.*, 1999; Björnsson *et al.*, 2002; Juretschko *et al.*, 2002). Recientemente se ha demostrado que la subdivisión *Anaerolineae* comprende dos clases, *Anaerolineae* y *Caldilineae*, que fueron aisladas de fango granular anaeróbico termofílico (Sekiguchi *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2006). El phylum *Chloroflexi* engloba muchos morfotipos, como el 0092, el 0803 y el 0914.

### 1.1. Morfotipo 0803

El morfotipo 0803 ha sido asociado al género *Caldilinea* dentro del phylum *Chloroflexi* y no, como se había considerado previamente, en la subdivisión *Rubrivivax* de la clase betaproteobacterias. Constituye alrededor del 20% del total de la población de bacterias filamentosas del phylum *Chloroflexi* y, junto con el morfotipo 0092, componen la fracción dominante de dicho phylum (Kragelund *et al.*, 2011).

Los filamentos del morfotipo 0803 se caracterizan por ser cortos (100-300  $\mu\text{m}$ ), rectos/ligeramente curvados y con un diámetro de 0,8-1,1  $\mu\text{m}$ . En ocasiones pueden ser observados asociándose a partículas inorgánicas (Eikelboom, 2000;

Jenkins et al., 2004). Este morfotipo filamentoso consume glucosa con oxígeno, nitrato y nitrato como aceptores de electrones, por lo que podría ser desnitrificante. Además, podría jugar un papel importante en la conversión de macromoléculas por la elevada actividad exoenzimática observada (Kragelund et al., 2011). Son normalmente filamentos Gram negativos, aunque a veces la respuesta puede ser variable. Con la tinción Neisser los filamentos aparecen como negativos, aunque pueden presentar gránulos positivos (Kragelund et al., 2011). Algunos autores han encontrado reacción positiva (color púrpura) a la tinción de Neisser (Eikelboom, 2006).

### 1.2. Morfotipo 0914

El morfotipo 0914 se identifica como un miembro del phylum *Chloroflexi* dentro del subgrupo 1 (Speirs et al., 2010). Este morfotipo se describe como un filamento con un diámetro de 1-1,2 µm y una longitud inferior a 50 µm que se localiza tanto dentro como fuera del flóculo. Son bacterias Gram y Neisser negativas (Eikelboom, 2006). Los morfotipos filamentosos 0803 y 0914 han sido

considerados a nivel convencional dos formas de un mismo organismo (Eikelboom, 2000; 2006). Cuando un morfotipo 0803 aparecía, el tipo 0914 desaparecía y viceversa, sugiriendo de esta manera que eran dos formas complementarias del mismo filamento bacteriano. Por su parte, Jenkins et al. (2004) consideran que se trata de dos organismos diferentes, siendo la clave identificativa en el caso del morfotipo 0914 la presencia de gránulos irregulares de azufre *in situ*.

### 1.3. Morfotipo 0092

El morfotipo 0092 ha sido desclasificado del phylum *Bacteroidetes* para clasificarlo dentro del phylum *Chloroflexi* (Speirs et al., 2009). Este morfotipo se asocia a un amplio rango de condiciones ambientales, entre ellas, condiciones aerobias, anaerobias y anóxicas. Aparece en plantas de fangos activos de todo el mundo, ha sido asociado a edades de fango elevadas (> 15 días) y a sistemas de eliminación de fósforo (EBPR), donde la biomasa es reciclada repetidamente entre la zona anaerobia y la zona aerobia (Jenkins et al., 2004). Se presentan como filamentos cor-

tos, con un diámetro entre 0,8 y 1 µm y extendiéndose desde el flóculo. Presentan respuesta negativa a la tinción Gram y positiva a la tinción Neisser (Jenkins et al., 2004). Se han identificado dos variantes del morfotipo filamentoso 0092 (A y B), diferenciándose en el diámetro del filamento (Speirs et al., 2009).

Los estudios ecológicos en EDAR a escala real que relacionan los parámetros operacionales y fisicoquímicos de rutina en las instalaciones con la abundancia de bacterias filamentosas, tienen un especial interés en el control y optimización del proceso. La calidad de los resultados de estos estudios comienza indudablemente con una taxonomía firme basada en una elevada especificidad, como por ejemplo la que ofrece actualmente la técnica FISH para la detección y posterior cuantificación de los organismos filamentosos. El uso paralelo de la técnica convencional se encuentra muy extendido en el control rutinario de las EDAR y es utilizada en numerosos estudios. Debido a la escasa especificidad de dicha técnica, en algunas ocasiones se pueden producir errores en la identificación y cuantificación. Por ello, el objeti-

**Tabla 1.** Valores promedio, desviación estándar (DE) y rango de las variables de proceso en los reactores biológicos.

EDAR	EDAR QB		EDAR CX (A+B C+D)		EDAR DE		EDAR CS (R1, R2)	
Variables	Media +/- DE	Rango	Media +/- DE	Rango	Media +/- DE	Rango	Media +/- DE	Rango
SSLM (mg/l)	2.460 +/- 386	1.790 - 3.120	1.938 +/- 549	1.100 - 2.980	2.239 +/- 230	2.500 - 3.780	4.127 +/- 1.157	2.460 - 6.800
SSVLM (%)	79,2 +/- 3,7	68 - 87	83,1 +/- 4,6	70 - 91	69,4 +/- 3,3	62 - 75	72,2 +/- 4,7	61 - 81
Temperatura (°C)	21,3 +/- 3,7	14 - 29	20,2 +/- 3,5	15 - 27	18,5 +/- 4,2	11 - 26	22,1 +/- 4,1	15 - 29
Carga masica (kg DBO <sub>5</sub> /kg SSVLM.d)	0,20 +/- 0,09	0,08 - 0,47	0,30 +/- 0,10	0,14 - 0,49	0,13 +/- 0,04	0,03 - 0,19	0,28 +/- 0,10	0,14 - 0,57
Tiempo de retención hidráulico	17,0 +/- 2,0	14 - 22	6,4 +/- 0,4	5,3 - 6,9	14,9 +/- 1,9	12 - 19	5,5 +/- 0,5	4,7 - 6,3
Edad del fango (días)	10,8 +/- 5,7	5,2 - 29	7,1 +/- 4,9	2,7 - 22	17,2 +/- 5,4	10 - 31	7,3 +/- 2,7	3,1 - 13



**Tabla 2.** Sondas empleadas en la identificación de los morfotipos 0803, 0914 y 0092.

	Sonda	Especificidad	Secuencia	Referencia
Caldilinea	Caldi-0678	Género <i>Caldilinea</i>	TTCCACCACTACACCGGG	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
	Comp1-Caldi-0678	Sonda competidor 1	TTTCACCACTACACCGGG	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
	Comp2-Caldi-0678	Sonda competidor 2	TTCCACCGCTACACCGGG	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
Tipo 0803	T0803-0654	Morfotipo 0803	ACACC CTCTCACYRCCT	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
	T0803ind-0642	Morfotipo 0803	CTGCCTCAAGCTACTCAG	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
	h1 T0803ind-0607	Helper	AGTTAAGCCAGGAGATTT	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
	h2 T0803ind-0625	Helper	TTTCCAACGACCCCTCCC	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
	h3 T0803ind-0662	Helper	GAATTCTACACCCCTCTC	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
	h4 T0803-0680	Helper	ATTCCACCACTACACCGG	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
Tipo 0092	CFX197	Variante A	TCCCGGAGCGCTGAACT	Speirs <i>et al.</i> (2009)
	CFX197comp	Sonda competidora	TCCCGAAGCGCTGAACT	Speirs <i>et al.</i> (2009)
	CFX223	Variante B	GGTGCTGGCTCCTCCAG	Speirs <i>et al.</i> (2009)
	CFX223 H202	Helper	AGCGCCTGAGCTTCAGTCATC	Speirs <i>et al.</i> (2009)
	CFX223 H241	Helper	CGTTACCTTACCAACTAGCTGATGG	Speirs <i>et al.</i> (2009)
Tipo 0914	CFX67a	Tipo 0914	TTCCGAAGATCAGGTTCG	Speirs <i>et al.</i> (2009)
	CFX67-H46	Helper	TTCGACTTGCATGTGTTARGC	Speirs <i>et al.</i> (2009)
	CFX67 comp	Sonda competidora	TTCCGAAGATCGGGTTCG	Speirs <i>et al.</i> (2009)
	CFX67b	Tipo 0914	TTCCGAAGATTAGGTTCG	Speirs <i>et al.</i> (2009)
	CFX67-H95	Sonda helper	CCGTRCGCCACTAACCYT	Speirs <i>et al.</i> (2009)
Phylum <i>Chloroflexi</i>	CFX1223	Phylum <i>Chloroflexi</i>	CCATTGTAGCGTGTGTGTMG	Björnsson <i>et al.</i> (2002)
	CFX1223-H1206	Helper	CCCWGGAYATAAAGGCC	Speirs <i>et al.</i> (2009)
	CFX1223-H1243	Helper	TTTAGCAACYATTGTACCGR	Speirs <i>et al.</i> (2009)
	GNSB914	Phylum <i>Chloroflexi</i>	AAACCACAGCTCCGCT	Gich <i>et al.</i> (2001)
	GNSB914-H927	Helper	GCTTGTGCGGGCCC	Speirs <i>et al.</i> (2009)
	GNSB914-H958	Helper	TTCTTCGYTTGCATCGAATT	Speirs <i>et al.</i> (2009)

vo de este estudio fue comparar la abundancia de los morfotipos 0803, 0092 y 0914 obtenida con ambas técnicas: microscopía convencional y FISH, utilizando muestras procedentes de 4 EDAR de la Comunidad Valenciana. Los resultados obtenidos han permitido establecer las diferencias entre ambas técnicas, estableciendo la desviación originada por el empleo de la técnica convencional.

## 2. Material y métodos

### 2.1. Toma de muestras

Se tomaron muestras del licor mezcla con una frecuencia quincenal durante un año (diciembre 2008-diciembre 2009) en las siguientes EDAR de la Comunidad Valenciana:

- EDAR QB: sistema de fangos activos de mezcla completa con eliminación de nitrógeno mediante aireación intermitente. Caudal medio: 35.023 m<sup>3</sup>/día. Población: 166.942 habitantes equivalentes (he).

- EDAR CS: sistema de fangos activos de flujo en pistón con dos líneas en paralelo de tratamiento biológico. Caudal R1: 21.837 m<sup>3</sup>/día. Caudal R2: 12.320 m<sup>3</sup>/día. Población: 193.773 he.

- EDAR DE: sistema de fangos activos en régimen de oxidación total con eliminación de nitrógeno. Caudal: 19.089 m<sup>3</sup>/día. Población: 45.152 he.

- EDAR CX: sistema de fangos activos de flujo en pistón con dos líneas en paralelo de tratamiento

biológico. Caudal A+B: 15.784 m<sup>3</sup>/día. Caudal C+D: 23.677 m<sup>3</sup>/día. Población: 178.080 he.

Las muestras procesadas, que sumaron un total de 140, fueron tomadas a la salida de los reactores biológicos, siendo estas de carácter simple y puntual. Los valores de las variables de proceso de los reactores se detallan en la **Tabla 1**.

### 2.2. Identificación y recuento de bacterias filamentosas

El análisis convencional de morfotipos filamentosos se realizó antes de las 48 horas posteriores a la toma de muestras. Para la identificación se utilizaron las claves propuestas por Eikelboom (2000; 2006) y Jenkins *et al.* (2004), empleando para ello

microscopía óptica de contraste de fases (Zeiss, modelo Axiostar).

En la técnica FISH las muestras fueron fijadas antes de las 24 horas posteriores a la toma de muestras. A continuación fueron conservadas hasta el momento de su hibridación con las distintas sondas (Tabla 2). La observación de las muestras hibridadas se realizó con un microscopio de epifluorescencia (Olympus, modelo BX50). La densidad de organismos en ambas técnicas fue estimada según el criterio subjetivo propuesto por Eikelboom (2000), que establece el índice de filamentos (IF) dentro de una escala ordinal del 0-5.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Identificación

##### 3.1.1. Microscopía convencional

La microscopía convencional, basándose en las características mor-

fológicas y respuestas a las tinciones diferenciales, no permitió diferenciar los morfotipos 0803 y 0914. La observación de formas cuadradas de azufre intracelular fue escasa (Figura 1b), siendo esta la clave identificativa, según Jenkins *et al.* (2004), para la identificación del morfotipo 0914. Por tanto, la identificación y cuantificación se realizó agrupando ambos morfotipos en uno (tipo 0803/0914) (Eikelboom, 2006).

El morfotipo 0092, debido a su estrecho diámetro celular, su localización principalmente intraflocular y su morfología celular rectangular, similar a otros morfotipos, presenta una gran dificultad en la identificación en muestras con una elevada diversidad de bacterias filamentosas. Estas son las razones por las cuales se utilizó la clave identificativa propuesta por Jenkins *et al.* (2004), la cual se basa en la respuesta Neisser positiva de color púrpura (Figura 2a).

Los morfotipos 0803/0914 y 0092 fueron identificados y cuantificados en todos los reactores de las EDAR estudiadas, observándose su mayor abundancia en las EDAR QB, DE y CS (Figura 3).

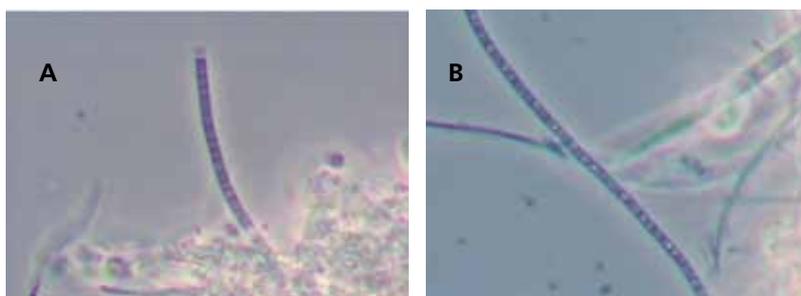
##### 3.1.2. Técnica FISH

El uso de las sondas moleculares disponibles en la técnica FISH ha revelado la presencia de los morfotipos 0803 (sondas T0803-0654 y T0803ind-0642), 0914 (sonda CFX67a) y 0092 (sondas CFX197 y CFX223) (Figuras 4, 5 y 6).

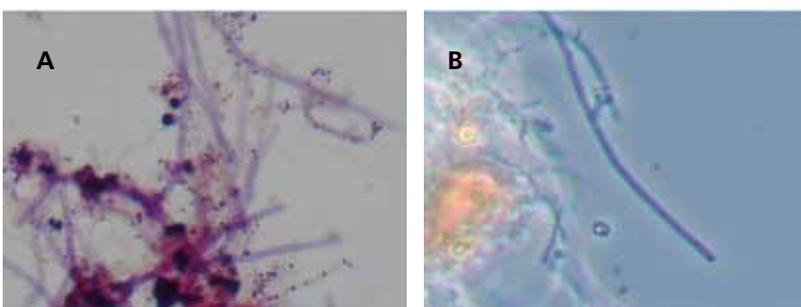
Se identificó a los morfotipos 0803 y 0092 como las bacterias filamentosas dominantes dentro del phylum *Chloroflexi* (Figura 7), resultados que corroboran los encontrados por otros autores (Kragelund *et al.*, 2011). En el caso del morfotipo 0803 se observaron respuestas positivas a la sondas T0803-0654 (doméstica) y T0803ind-0642 (industrial) en todas las EDAR, mientras que en el morfotipo 0092 fue la sonda CFX 197 (variante A) la que mostró mayor abundancia. El morfotipo 0914, que presentó la menor abundancia, fue detectado solo con la sonda CFX67a, siendo la respuesta negativa al utilizar la sonda CFX67b. Se observa que los IF promedio de las sondas del morfotipo 0803 fueron claramente superiores a la del morfotipo 0914, indicando un predominio sobre este último y la coexistencia de ambos como candidatas a especies diferentes. Esto último estaría en contra de lo sugerido por Eikelboom (2006), que indica que podrían tratarse de dos estados de un mismo morfotipo.

La asociación de los morfotipos 0803, 0914 y 0092 con carga máxima baja ( $< 0,15 \text{ Kg DBO}_5/\text{kg SSLM.d}$ ) y edad del fango alta ( $> 15$  días), sugeridos por Eikelboom (2000; 2006) y Jenkins *et al.* (2004), no fue obser-

**Figura 1.** Morfotipo 0803/0914 identificado mediante microscopía convencional (a) QB (b) DE. Contraste de fases, 1000x.

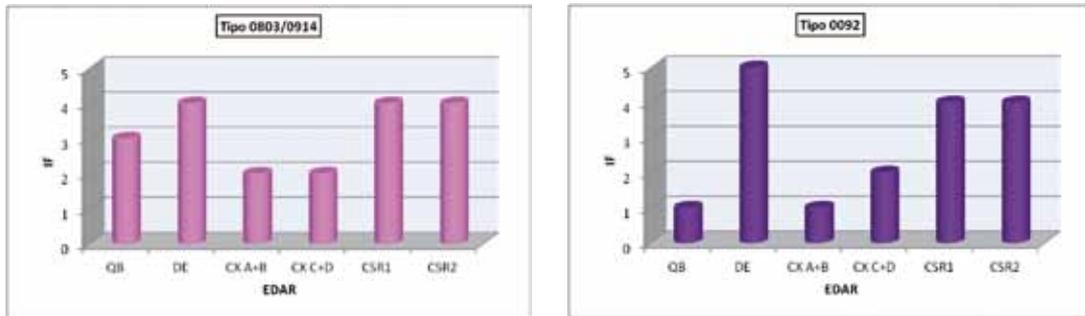


**Figura 2.** Morfotipo 0092 identificado mediante microscopía convencional (a) QB. Tinción de Neisser. Campo claro, 1000x (b) DE. Contraste de fases, 1000x.





**Figura 3.** Valores promedio de IF de los morfotipos filamentosos en cada una de las líneas de tratamiento según microscopía convencional.



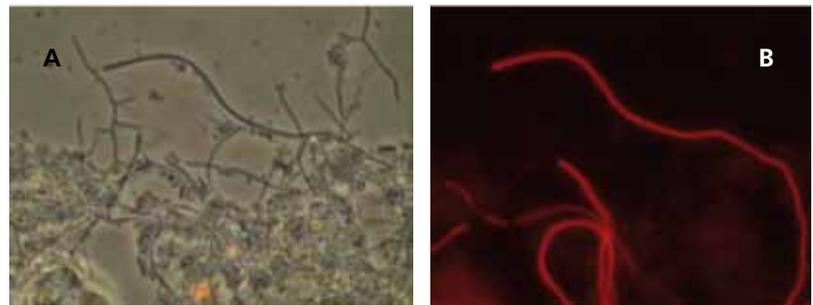
vada en todos los casos. En el caso de las EDAR CX y CS, que operaron con edad del fango y carga media similar (**Tabla 1**), los morfotipos 0092 y 0803 fueron dominantes en CS, mientras que en CX fueron poco abundantes. Sería interesante completar los estudios a escala real mediante el empleo del análisis directo del gradiente para establecer la influencia de la edad del fango y la carga másica en función del resto de variables ambientales (ter Brack, 1986).

### 3.2. Comparación entre la técnica convencional y FISH

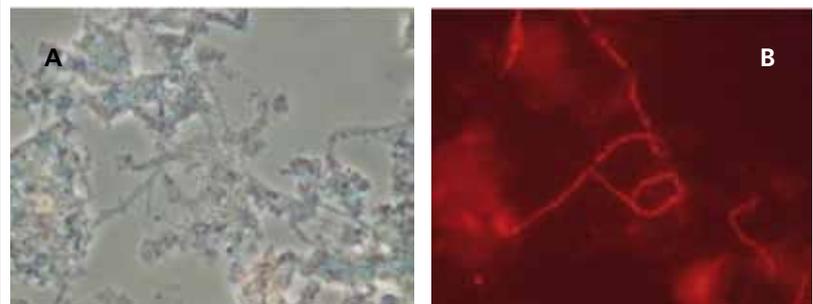
#### 3.2.1. Morfotipo 0803/0914

Los resultados de comparación de la abundancia del morfotipo 0803/0914 entre ambas técnicas fueron significativos, observándose en todas las EDAR estudiadas una infravaloración de dicho morfotipo al emplear la técnica convencional (**Figuras 8, 9, 10 y 11**). En el caso de la EDAR QB (**Figura 8**) la cuantificación a través de la sonda T0803-0654 mostró hasta 3-4 puntos por encima de la escala subjetiva. Dichas diferencias pudieron deberse a la localización principalmente intraflocular de la bacteria y a la reacción Gram negativa, características por las cuales podría pasar desapercibida.

**Figura 4.** Morfotipo 0803. EDAR QB (a) Contraste de fases, 1000x (b) FISH, sonda T0803-0654, 1000x.



**Figura 5.** Morfotipo 0914. EDAR CS (a) Contraste de fases, 1000x (b) FISH, sonda CFX67a, 1000x.



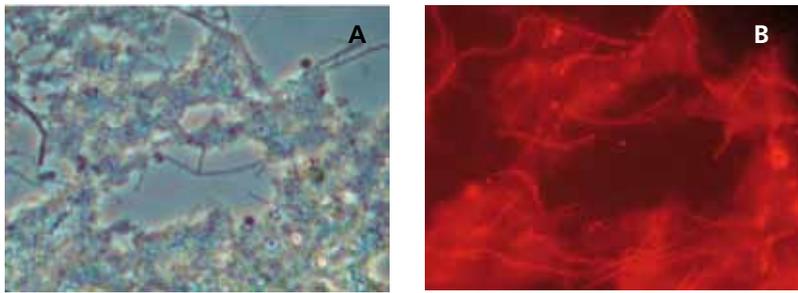
El morfotipo 0914 fue identificado en las EDAR QB (**Figura 8**), CS (**Figura 10**) y DE (**Figura 11**) a través de la sonda específica CFX67a. Dicho morfotipo presentó una fluctuación significativa en su abundancia, asociándose siempre con la sonda T803-0654 y probablemente relacionándose con un rango más estrecho de condiciones ambientales. El uso

exclusivo de la técnica convencional no revelaría su presencia, y por tanto, su valor bioindicador quedaría de alguna manera enmascarado.

#### 3.2.2. Morfotipo 0092

Los resultados de comparación de abundancia del morfotipo 0092 entre ambas técnicas también fueron significativos (**Figuras 12, 13, 14**

**Figura 6.** Morfotipo 0092. EDAR CX (a) Contraste de fases, 1000x (b) FISH, sonda CFX 197, 1000x



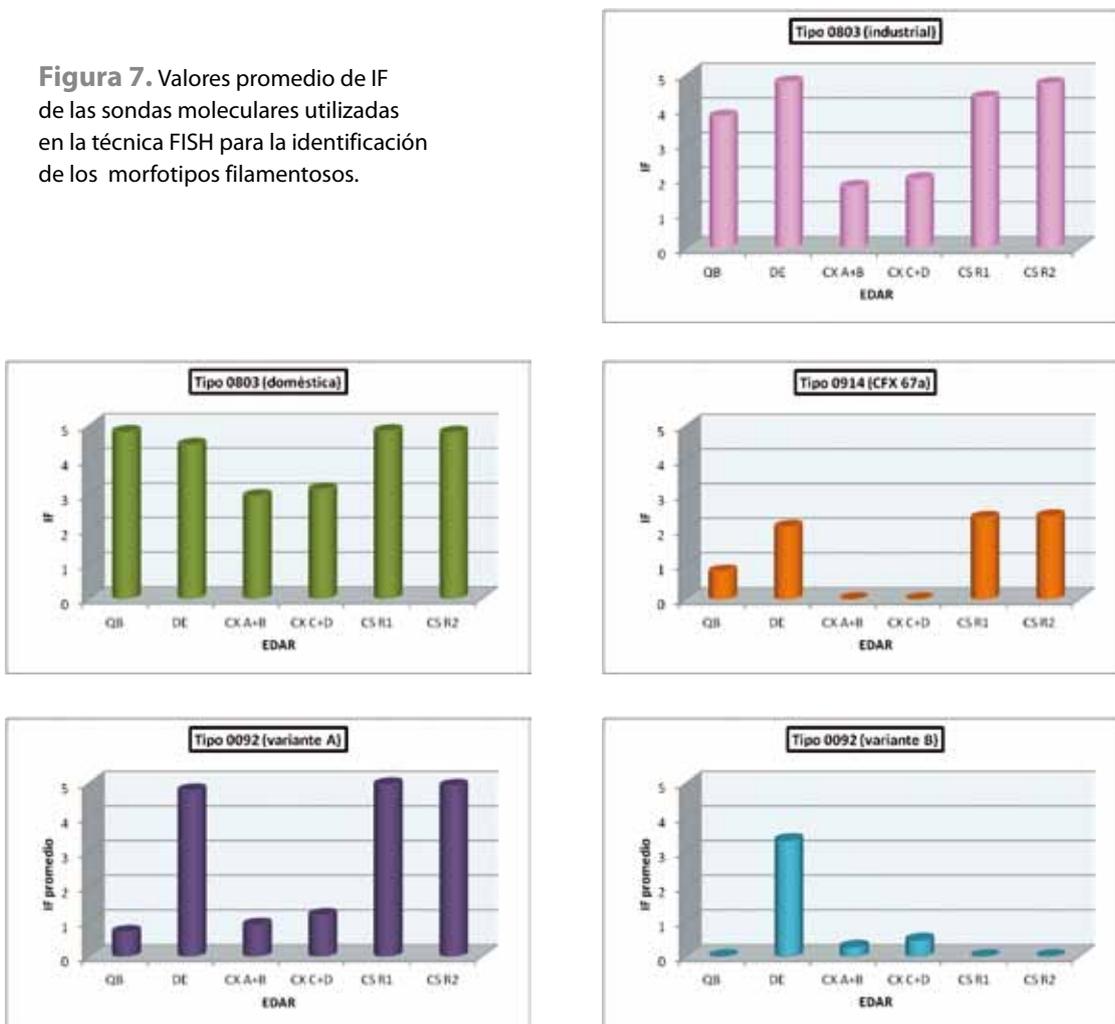
y 15). En algunos muestreos de las EDAR QB y CX el criterio de abundancia observado a través de la técnica convencional fue mayor que el empleado mediante la técnica FISH (Figuras 12 y 13). Dichas diferencias podrían ser debidas a la reacción Neisser positiva color púrpura que

según Eikelboom (2006) presenta ocasionalmente el morfotipo 0803. El caso contrario fue observado en algunos muestreos de las EDAR CS y DE (Figuras 14 y 15), donde la cuantificación a través de técnica FISH fue superior a la convencional, posiblemente debido a que no

todos los filamentos del morfotipo 0092 responden positivamente a la reacción de Neisser. La diferencia significativa encontrada en la identificación y cuantificación del morfotipo 0092 entre ambas técnicas sugiere que el empleo de la reacción positiva color púrpura como clave identificativa propuesta por algunos autores (Jenkins et al., 2004; Eikelboom, 2006) no sería adecuada.

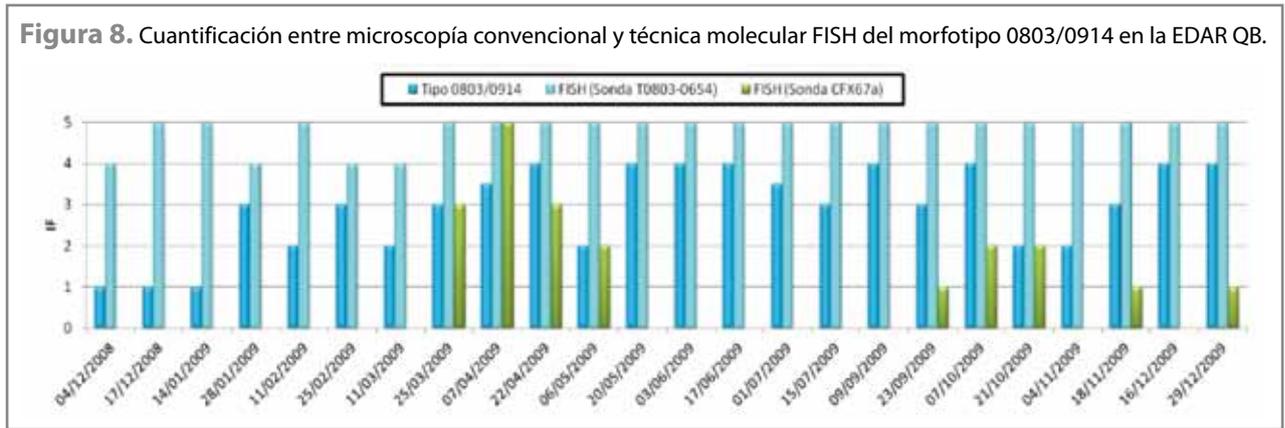
El morfotipo 0092 variante B (sonda CFX223) se observó dominante durante largos periodos solamente en la EDAR DE, la cual operó con una edad del fango promedio superior a 15 días en régimen de oxidación total. Este hecho podría sugerir que la variante B está más asociada que la A con la edad del fango, puesto que

**Figura 7.** Valores promedio de IF de las sondas moleculares utilizadas en la técnica FISH para la identificación de los morfotipos filamentosos.

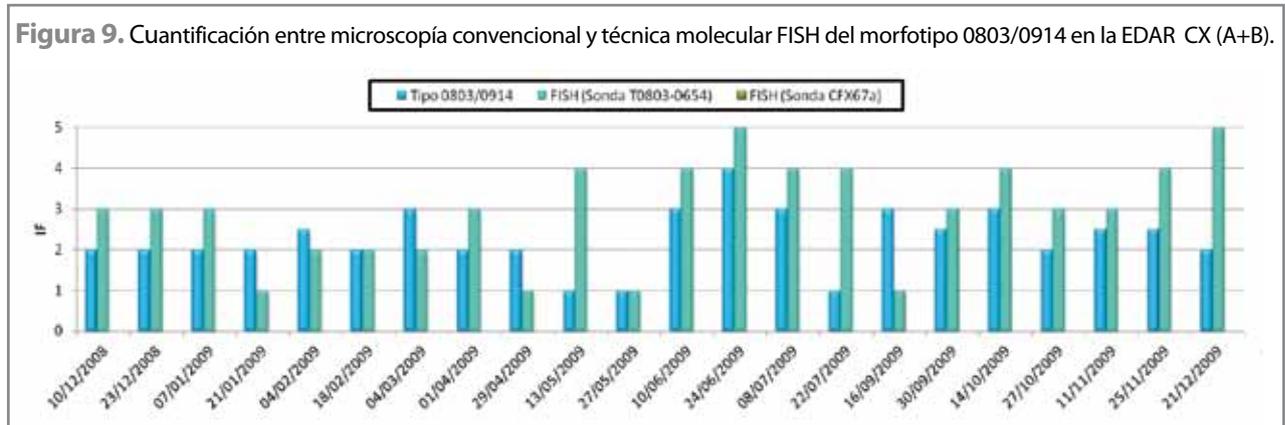




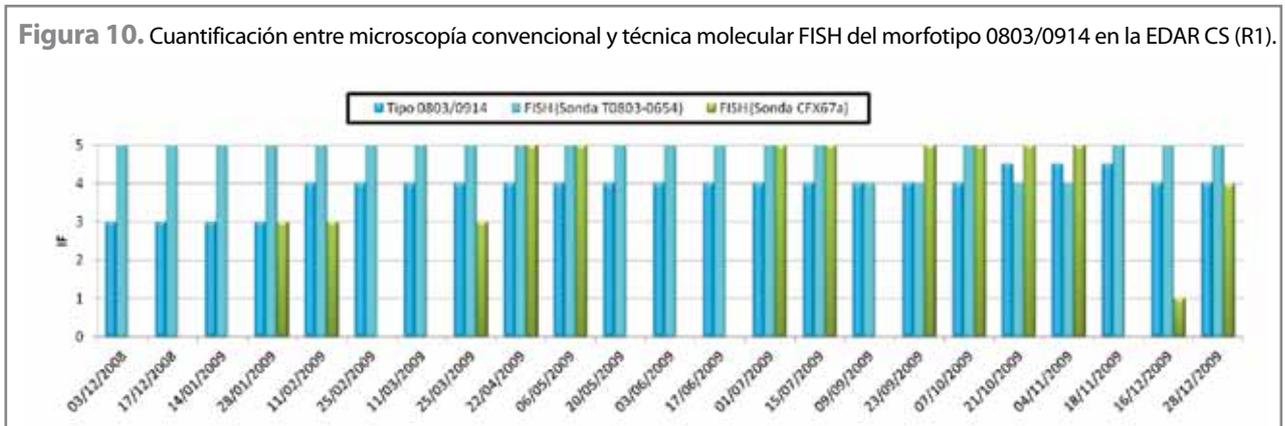
**Figura 8.** Cuantificación entre microscopía convencional y técnica molecular FISH del morfotipo 0803/0914 en la EDAR QB.



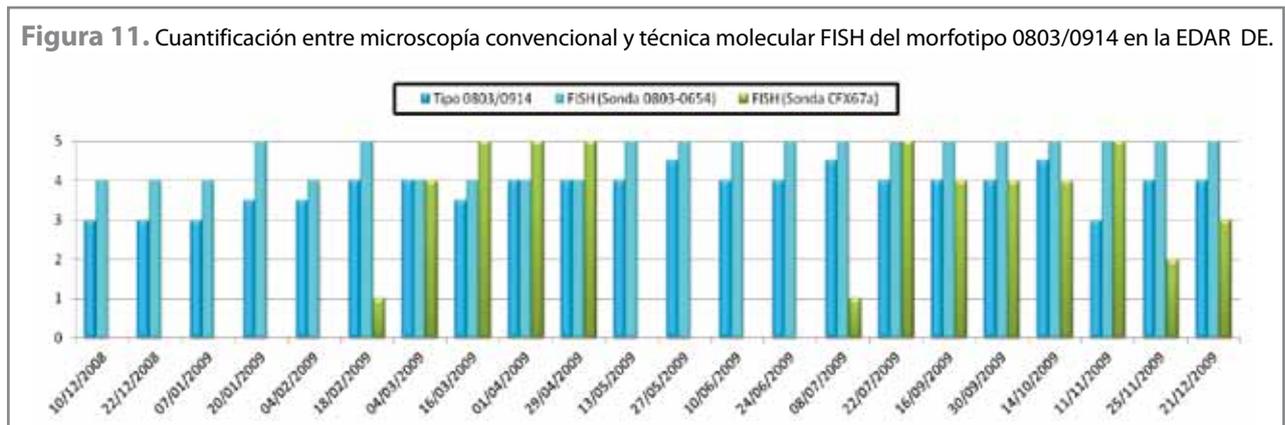
**Figura 9.** Cuantificación entre microscopía convencional y técnica molecular FISH del morfotipo 0803/0914 en la EDAR CX (A+B).



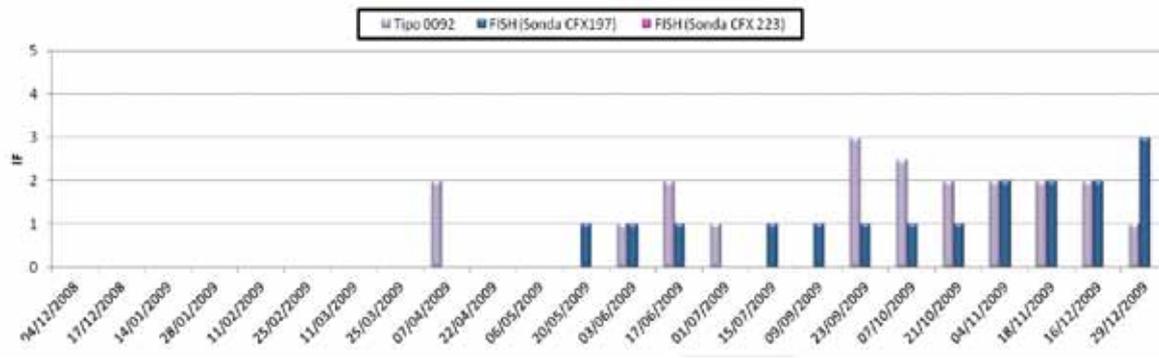
**Figura 10.** Cuantificación entre microscopía convencional y técnica molecular FISH del morfotipo 0803/0914 en la EDAR CS (R1).



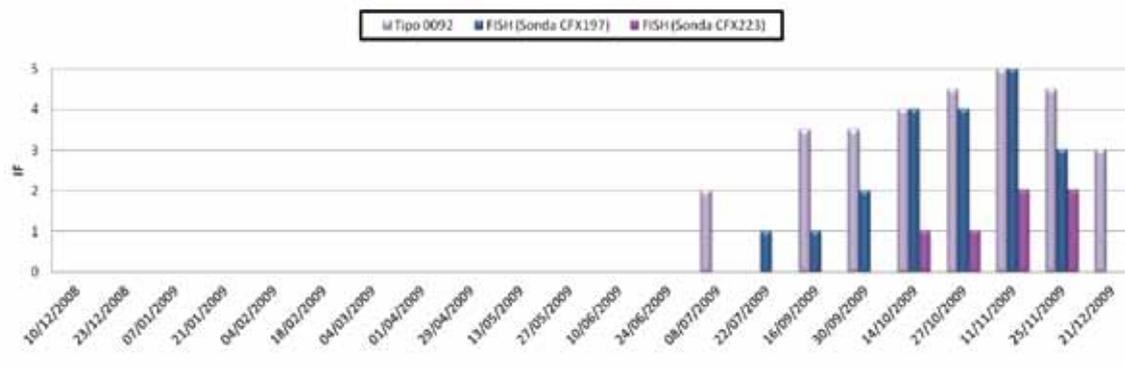
**Figura 11.** Cuantificación entre microscopía convencional y técnica molecular FISH del morfotipo 0803/0914 en la EDAR DE.



**Figura 12.** Cuantificación entre microscopía convencional y técnica molecular FISH del morfotipo 0092 en la EDAR QB.



**Figura 13.** Cuantificación entre microscopía convencional y técnica molecular FISH del morfotipo 0092 en la EDAR CX (A+B).



esta última se observó frecuentemente en todas las EDAR estudiadas

#### 4. Conclusiones

Los resultados de comparación entre la técnica convencional y FISH en la identificación y cuantificación de los morfotipos 0803, 0914 y 0092 mostraron que:

- Se apreciaron diferencias significativas al comparar los resultados en la cuantificación e identificación de los morfotipos filamentosos 0803, 0914 y 0092. Tales diferencias se debieron probablemente a la dificultad en la observación de los filamentos intrafloculares Gram negativos y en ocasiones, a la respuesta similar de los morfotipos 0803/0914 y 0092 a la tinción Neisser. En este último caso, la reacción Neisser color púrpura no sería adecuada como clave para la identificación del morfotipo 0092.

- La técnica FISH, contrariamente a la convencional, diferenció a los morfotipos 0803 y 0914. Esto permitirá conocer a través de futuros estudios de análisis multivariante la ecofisiología de ambos morfotipos en las EDAR a escala real.

- La asociación de los morfotipos 0803, 0914 y 0092 con carga másica baja y edad del fango alta no fue observada en todos los casos. Solo la variante B del morfotipo 0092 (sonda CFX223) lo hizo en régimen de oxidación total, pudiendo ser la única de todos los morfotipos que se relacione con edad del fango elevada (> 15 días).

#### 5. Agradecimientos

Este estudio forma parte del proyecto de investigación 'Estudio integrado del proceso de fangos activos', financiado por la Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales

de la Comunidad Valenciana (EP-SAR). Agradecer la colaboración de las empresas de explotación AVSA-Egevasa, DAM, Facsa, OMS-Sacede y del Subprograma MICINN PTA-2011.

#### Bibliografía

[1] Amann, R. (1995). *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. En: Molecular Microbial Manual. Akkermans A.D.L.; van Elsas, J.D.; de Bruijn, F.J. págs. 1-15. Kluwer Academic Publications.

[2] Beer, M.; Seviour, E.M.; Kong, Y.; Cunningham, M.; Blackall, L.L.; Seviour, R.J. (2002). Phylogeny of the filamentous bacterium Eikelboom Type 1851, and design and application of a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe for its fluorescence in situ identification in activated sludge. FEMS Microbiol. Lett., núm. 207, págs. 179-183.

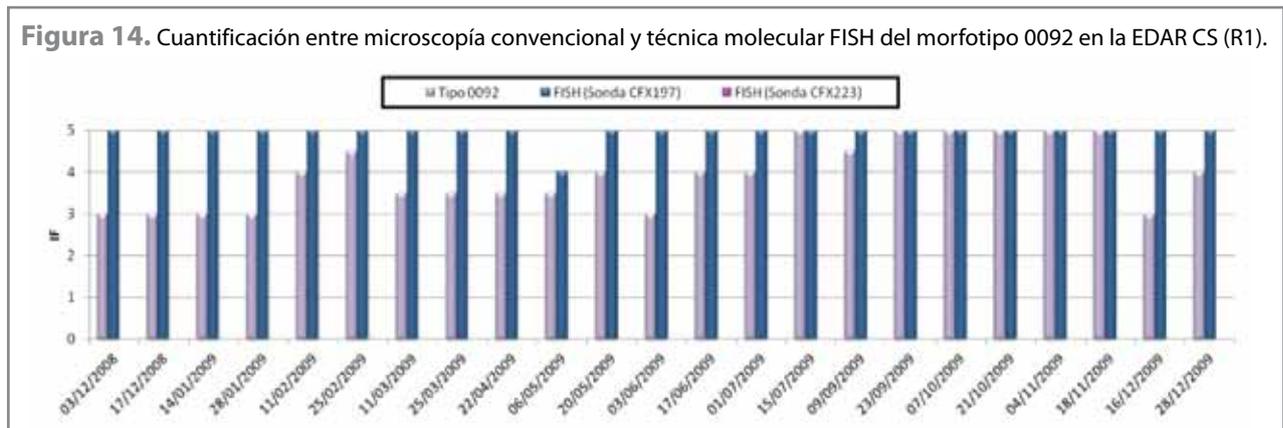
[3] Beer, M.; Stratton, H.M.; Griffiths, P.C.; Seviour, R.J. (2006). Which are the polyphosphate accumulating organisms in full-scale activated sludge enhanced biological phosphate removal systems in Australia?. J. Appl Microbiol., núm. 100, págs. 233-243.

[4] Björnsson, L.; Hugenholtz, P.; Tyson, G.W.; Blackall, L. (2002). Filamentous *Chloroflexi* (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. Microbiology, núm.148, págs. 2.309-2.318.

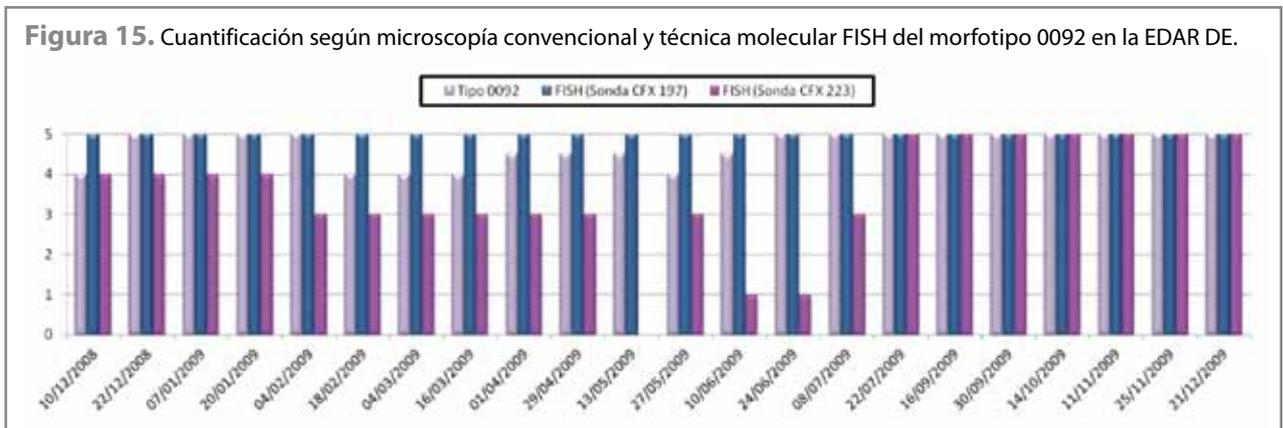
[5] Eikelboom, D.H.; Van Buijssen, H.J.J. (1983). Microscopic sludge investigation manual, 2nd edn. TNO Research Institute of Environmental Hygiene, Delft.



**Figura 14.** Cuantificación entre microscopía convencional y técnica molecular FISH del morfotipo 0092 en la EDAR CS (R1).



**Figura 15.** Cuantificación según microscopía convencional y técnica molecular FISH del morfotipo 0092 en la EDAR DE.



[6] Eikelboom, D. (2006). CD-ROM Identification and control of filamentous microorganisms in industrial activated sludge plants. IWA Publishing, London.

[7] Eikelboom, D.H. (1975). Filamentous organisms observed in activated sludge. *Water Res.*, núm. 9, págs. 365-388.

[8] Eikelboom, D.H. (2000). Process control of activated sludge plants by microscopic investigation. IWA Publishing, London.

[9] Gich, F.; García-Gil, J.; Overmann, J. (2001). Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. *Arch. Microbiol.*, núm. 177, págs. 1-10.

[10] Hugenholtz, P.; Goebel, B.M.; Pace, N.R. (1998). Impact of cultura-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.*, núm. 108, págs. 4.765-4.774.

[11] Hugenholtz, P.; Stackebrandt, E. (2004). Reclassification of *Sphaerobacter thermophilus* from the subclass Sphaerobacteridae in the phylum Actinobacteria to the class Thermomicrobia (emended description) in the phylum Chloroflexi (emended description). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, núm. 54 (6), págs. 2.049-2.051.

[12] Jenkins, D.; Richard, M.G.; Daigger, G.T. (1993). Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. 2ª Edition. Lewis publishers (Michigan).

[13] Jenkins, D.; Richard, M.; Daigger, G. (2004). Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming. 3th Ed.. Lewis publishers. Nueva York, EEUU.

[14] Juretschko, S.; Loy, A.; Lehner, A.; Wagner, M. (2002). The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated

sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst. Appl. Microbiol.*, núm. 25, págs. 84-99.

[15] Kong, Y.; Xia, Y.; Nielsen, P.H. (2008). Activity and identity of fermenting microorganisms in full-scale biological nutrient removing wastewater treatment plants. *Environ. Microbiol.*, núm. 10, págs. 2.008-2.019.

[16] Kragelund, C.; Levantesi, C.; Borger, A. (2007). Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecol.*, núm. 59, págs. 671-682.

[17] Kragelund, C.; Levantesi, C.; Borger, A.; Thelen, K.; Eikelboom, D.; Tandoi, V.; Kong, Y.; van der Waarde, J.; Krooneman, J.; Rossetti, S.; Thomsen, T.R.; Nielsen, P.H. (2007). Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecol.*, núm. 59, págs. 671-682.

[18] Kragelund, C.; Thomsen, T.R.; Mielczarek, A.T.; Nielsen, P.H. (2011). Eikelboom's morphotype 0803 in activated sludge belongs to the genus *Caldilinea* in the phylum Chloroflexi. *FEMS Microbiol. Ecol.*, núm. 76, págs. 451-462.

[19] Madoni, P.; Davoli, D.; Gibin, G. (2000). Survey of filamentous microorganisms from bulking and foaming activated-sludge plants in Italy. *Water Res.*, núm. 34(6), págs. 1.767-1.772

[20] Morgan-Sagastume, F.; Larsen, P.; Nielsen, J.L.; Nielsen, P.H. (2008). Characterization of the loosely attached fraction of activated sludge bacteria. *Water Res.*, núm. 42 (4-5), págs. 843-854.

[21] Nielsen, P.H.; Mielczarek, A.T.; Kragelund, C.; Nielsen, J.L.; Saunders, A.M.; Kong, Y.; Hansen, A.A.; Vollersten, J. (2010). A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants. *Water Res.*, núm. 44, págs. 5.070-5.088.

[22] Nielsen, P.H.; Kragelund, C.; Seviour, R.J. (2009). Identity and ecophysiology of filamentous bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiol. Rev.*, núm. 33, págs. 969-998.

[23] Sekiguchi, Y.; Kamagata, Y.; Nakamura, K.; Ohashi, A.; Harada, H. (1999). Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl. Environ. Microb.*, núm. 65, págs. 1.280-1.288.

[24] Seviour, R.J.; Blackall, L.L. (1999). *The Microbiology of Activated Sludge*. Kluwer Academic Publishers, USA.

[25] Speirs, L.; Mclroy, S.; Petrvski, S.; Seviour, R.J. (2011). The activated sludge bulking filaments Eikelboom morphotype 0914 is a member of the Chloroflexi. *Environ. Microbiol. Reports*, núm. 3(2), págs. 159-165.

[26] Speirs, L.; Nittami, T.; Mclroy, S.; Schroeder, S.; Seviour, R.J. (2009). Filamentous Bacterium Eikelboom Type 0092 in Activated Sludge Plants in Australia is a Member of the Phylum Chloroflexi. *Appl. Environ. Microbiol.*, núm. 8, págs. 2.446-2.452.

[27] Ter Braak, C.J.F. (1986). Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*, núm. 67, págs. 1.167-1.179.

[28] Yamada, T.; Sekiguchi, Y.; Hanada, S.; Imachi, H.; Ohashi, A.; Harada, H.; Kamagata, Y. (2006). *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the bacterial phylum Chloroflexi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, núm. 56, págs. 1.331-1.340.